

**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ALELOPÁTICA DE EXTRACTOS
VEGETALES SOBRE *Lactuca sativa***

ANA FERNANDA TRUJILLO SANCHEZ
CÓDIGO: 1088245253

UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA
FACULTAD DE TECNOLOGÍA
ESCUELA DE TECNOLOGÍA QUÍMICA
PEREIRA
2008

**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ALELOPÁTICA DE EXTRACTOS
VEGETALES SOBRE *Lactuca sativa***

**ANA FERNANDA TRUJILLO SANCHEZ
CÓDIGO: 1088245253**

**TRABAJO DE GRADO
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE TECNÓLOGA EN QUÍMICA**

**DIRECTOR:
OSCAR MARINO MOSQUERA MARTÍNEZ**

**UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA
FACULTAD DE TECNOLOGÍA
ESCUELA DE TECNOLOGÍA QUÍMICA
PEREIRA
2008**

AGRADECIMIENTOS

Muchas veces elegimos de la vida, dentro de un abanico de opciones, aquella opción en la que nos toca vivir muchas cosas por las que no queremos pasar, sin embargo, cuando miramos para atrás vemos con asombro el ahora y solo agradecemos por estar vivos, por tener la capacidad de empezar una vez más.

Este trabajo va dedicado a mi abuela Betty Echeverry y a Juan Carlos Londoño, quienes me apoyaron durante todo el desarrollo de mi formación tecnológica; a Juan por toda su ayuda al iniciar mis estudios y a mi abuela por ser mi amiga y confidente. También a las personas que me acompañaron y motivaron durante estos semestres, a Andres Fernando Londoño y Carolina Jaime; a los que me enseñaron y aconsejaron en diferentes aspectos de este trabajo, a mi amiga Jesica Leandra Ramírez y Tito Morales. Agradezco a todos los que de una manera u otra me dieron alientos y fortaleza, a Andrés Felipe Villa, Amparo Salazar, Lina María Trujillo, Julián Hernández, Gloria Inés Castro, Héctor Andrés Herrera, Ana Marcela Lagos, Jaime Salazar y familia y a mis compañeros de Ingeniería Mecánica que fueron tan enérgicos y positivos durante el pasado semestre. Agradezco al CIEBREG, por financiar este trabajo de investigación y en especial agradezco a mi madre por su cariño y cuidado incondicional.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
RESUMEN	VI
INTRODUCCIÓN	VIII
1. MARCO TEÓRICO	1
1.1 ACTIVIDAD ALELOPÁTICA	1
1.2 HERBICIDAS Y ALELOQUÍMICOS	2
1.2.1 Núcleos fitoquímicos que presentan actividad alelopática	4
1.3 GERMINACIÓN	4
1.3.1 Interacción de los aleloquímicos en la germinación	9
1.4 BIOENSAYO DE ACTIVIDAD ALELOPÁTICA	10
1.4.1 Antecedentes metodológicos e importancia de <i>L. sativa</i>	11
1.5 ZONA DE ESTUDIO: RESERVA NATURAL BREMEN-LA POPA (RNB-LP)	15
1.6 DESCRIPCIÓN DE LAS PLANTAS EN ESTUDIO	16
1.6.1 Familia Apocynaceae	17
1.6.2 Familia Asclepiadaceae	18
1.6.3 Familia Asteraceae	18
1.6.4 Familia Euphorbiaceae	20
1.6.5 Familia Rubiaceae	21
1.6.6 Familia Solanaceae	22
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	25
3. JUSTIFICACIÓN	27
4. OBJETIVOS	28
4.1 OBJETIVO GENERAL	28
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
5. MATERIALES Y MÉTODOS	29
5.1 ESPACIO DISPONIBLE PARA LA REALIZACION DEL BIOENSAYO	29
5.2 MATERIALES	29
5.2.1 Reactivos	29
5.2.2 Equipos	29
5.2.3 Material vegetal	29

5.3	MÉTODOS.....	30
5.3.1	Obtención de los extractos	30
5.3.2	Selección de los extractos a estudiar	30
5.4	CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA DE LOS EXTRACTOS.....	30
5.5	ENSAYO DE ACTIVIDAD ALELOPÁTICA	32
5.5.1	Descripción de la unidad experimental (UE).	32
5.5.2	Preparación de semillas..	32
5.5.3	Preparación de soluciones patrones.....	32
5.5.4	Preparación de controles:	32
5.6	TRATAMIENTO DE DATOS.....	34
5.6.1	Toma de datos:.....	35
5.6.2	Porcentaje de Germinación Relativo (PGR).....	35
5.6.3	Crecimiento Promedio de Radícula (CPR)	36
5.6.4	Índice de germinación (IG)	37
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
6.1	RECOLECCIÓN DE PLANTAS Y EXTRACTOS OBTENIDOS.....	38
6.2	CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA DE LOS EXTRACTOS DE LAS PLANTAS RECOLECTADAS	40
6.3	ACTIVIDAD ALELOPÁTICA.....	44
6.3.1	Actividad alelopática de los extractos de diclorometano.....	46
6.3.2	Actividad alelopática de los extractos metanólicos.....	49
7.	CONCLUSIONES	58
8.	RECOMENDACIONES.....	59
	BIBLIOGRAFÍA.....	60
	ANEXOS.....	67

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
TABLA 1. Tipos de núcleos fitoquímicos que han presentado propiedades alelopáticas en el bioensayo con <i>Lactuca sativa</i>	5
TABLA 2. Plantas receptoras a agentes alelopáticos (Macías et al., 1999).	12
TABLA 3. Patrones utilizados en cromatografía de capa delgada (TLC) para la detección de núcleos fitoquímicos	30
TABLA 4. Eluentes usados para la elución de extractos.	32
TABLA 5. Plantas recolectadas en Reserva Natural Bremen-La Popa en el 2005	39
TABLA 6. Núcleos fitoquímicos detectados por TLC, presentes en las plantas evaluadas para el bioensayo de actividad alelopática.	41
TABLA 7. Índice de germinación (IG) de los extractos de diclorometano.	47
TABLA 8. Índice de Germinación (IG) de los extractos metanólicos.	50

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1. Vías de liberación de aleloquímicos al ambiente, por parte de una planta (Chicy y Kielbaso, 1998).	3
FIGURA 2. Etapas de la germinación de las dicotiledóneas, como la lechuga (Jean-Yves et al., 2006).	8
FIGURA 3. Reserva Natural Bremen-La Popa (Filandia-Quindío-Colombia), en amarillo. Ventana 1 del CIEBREG (CRQ, 2007).	16
FIGURA 4. <i>Adenium multiflorum</i> (Apocynaceae).	17
FIGURA 5. <i>Ceropegia sandersonii</i> (Asclepiadaceae).	18
FIGURA 6. <i>Heterotheca mariana</i> (Asteraceae).	19
FIGURA 7. <i>Croton capitatus</i> (Euphorbiaceae).	21
FIGURA 8. <i>Mitchella repens</i> (Rubiaceae).	21
FIGURA 9. <i>Solanum carolinense</i> (Solanaceae).	23
FIGURA 10. Etapas para la obtención de extractos (Niño et al., 2007).	31
FIGURA 11. Procedimiento para la realización del bioensayo de actividad alelopática.	33
FIGURA 12. Unidad experimental (UE) empleadas para el bioensayo de actividad alelopática.	34
FIGURA 13. Plántulas de <i>L. sativa</i> germinadas frente al extracto de diclorometano de la especie <i>Lepidaploa lehmannii</i> (UTP-135, Asteraceae) a 1000 mg/L.	36
FIGURA 14. Criterios para la selección de los extractos activos e inactivos.	37
FIGURA 15. Sitios de recolección, en la Reserva Natural Bremen-La Popa (Filandia-Quindío-Colombia).	38
FIGURA 16. Núcleos fitoquímicos presentes en los extractos de diclorometano. .	40
FIGURA 17. Núcleos fitoquímicos presentes en los extractos de metanol.	43
FIGURA 18. Secuencia de concentraciones de evaluación para extractos activos	45

FIGURA 19. Crecimiento Promedio de Radícula (CPR) del extracto diclorometano de <i>C. acuminata</i> (UTP-127, Asteraceae) a 125 mg/L, frente al bioensayo de alelopatía con semillas de <i>L. sativa</i>	48
FIGURA 20. Porcentaje de Germinación Relativa (PRG) del extracto de diclorometano de <i>C. acuminata</i> (UTP-127) a 125 mg/L, frente al bioensayo de alelopatía con semillas de <i>L. sativa</i>	48
FIGURA 21. Crecimiento de Radícula de los extractos metanólicos activos a 125 mg/L sobre semillas de <i>L. sativa</i>	51
FIGURA 22. Porcentaje de Germinación de los extractos metanólicos activos a 125 mg/L sobre semillas de <i>L. sativa</i>	51
FIGURA 23. Crecimiento de Radícula de los extractos metanólicos activos a 31,25 mg/L sobre semillas de <i>L. sativa</i>	52
FIGURA 24. Porcentaje de Germinación de los extractos metanólicos activos a 31,25 mg/L sobre semillas de <i>L. sativa</i>	53
FIGURA 25. Porcentaje de las familias que presentaron actividad alelopática evaluadas en este trabajo.	56

RESUMEN

En este estudio se determinó la actividad alelopática de un grupo de extractos de plantas silvestres de la Reserva Natural Bremen-La Popa (**RNB-LP**, Filandia-Quindío-Colombia), con la finalidad de identificar aquellos que puedan ser utilizados como agentes herbicidas. Las plantas fueron recolectadas por el Grupo de Biotecnología Productos Naturales (**GB-NP**). El GB-PN seleccionó veintiún (21) especies de las familias Apocynaceae, Asclepiadaceae, Asteraceae, Euphorbiaceae, Rubiaceae y Solanaceae, las cuales fueron sometidas a lixiviaciones sucesivas para obtener los extractos de *n*-hexano, diclorometano y metanol.

La determinación del potencial alelopático de los extractos de diclorometano y de metanol de las plantas recolectadas, se realizó evaluando la germinación y el crecimiento de las semillas de lechuga (*Lactuca sativa*, Asteraceae) tratadas con un volumen y concentración determinada del extracto a evaluar. Los resultados obtenidos corresponden al Porcentaje de Germinación Relativa (**PGR**) y al Crecimiento Promedio de la Radícula (**CPR**), con los cuales se calculó el Índice de Germinación (**IG**). De los extractos de diclorometano solo tuvo efecto inhibitorio la especie *Critoniella acuminata* (UTP-127, Asteraceae); mientras que doce extractos metanólicos, fueron activos. Entre estos los de *Solanum sp.* (UTP-129, Solanaceae) e *Hyeronima sp.* (UTP-130, Euphorbiaceae), tuvieron el mayor efecto inhibitorio.

Palabras claves: actividad alelopática, bioprospección, efecto inhibitorio, herbicidas, *Lactuca sativa*, Índice de Germinación, Porcentaje de Germinación Relativo, Crecimiento Promedio de la Radícula.

ABSTRACT

In this study it was determined the allelopathic activity of a group of plant extracts which were collected in a Nature Reserve Bremen-La Popa (RNB-LP, Filandia-Quindío-Colombia), with the aim of identifying those agents can be used as herbicides. The plants were collected by the Natural Products Group Biotechnology (GB-NP). The GB-PN selected twenty-one (21) species of the family Apocynaceae, Asclepiadaceae, Asteraceae, Euphorbiaceae, Rubiaceae and Solanaceae, which were subjected to successive leachate to obtain extracts for *n*-hexane, dichloromethane and methanol.

The potential alellopathic determining of extracts from plants collected, was conducted to evaluate the germination and growth of seeds of lettuce (*Lactuca sativa*) treated with a fixed volume and concentration of the extract to assess. The results correspond to the Percentage of Germination Relative (PRG) and Growth Average of Radicle (CPR), which was calculated to get the Germination Index (IG). This was used for the selection of extracts of dichloromethane and methanol with allelopathic activity.

Dichloromethane extracts of the inhibitory effect *Critoniella acuminata* (UTP-127, Asteraceae) was the only one with the most active, while the methanol extract, twelve were active. Among these, the *Solanum sp.* (UTP-129, Solanaceae) and *Hyeronima sp.* (UTP-130, Euphorbiaceae), had the highest inhibitory effect.

Keywords: allelopathic activity, bioprospection, Germination Index, herbicides, inhibitory effect, *Lactuca sativa*, Percentage of Germination Relative and Growth Average Radicle.

INTRODUCCIÓN

Los herbicidas han sido usados para mantener la productividad de los cultivos, por ser unas sustancias que interfieren en el crecimiento de las arvenses que debilitan y perjudican las cosechas, debido a que compiten por nutrientes y agua. El empleo de herbicidas químicos es una medida temprana de control que desplaza las técnicas de control manual (Lu y Yanar, 2004).

Sin embargo, los herbicidas sintéticos de amplio espectro, que son los más comerciales, además de controlar las arvenses influyen negativamente en la salud de los seres vivos, deterioran las fuentes hídricas y el suelo, puesto que muchos de ellos, por sus características físico-químicas son difíciles de degradar. El uso indiscriminado de estas sustancias ha generado efectos tóxicos en las comunidades aledañas a los cultivos, por lo cual se deben plantear nuevas alternativas de control (Nivia, 2000; Cuenca y Ramírez, 2004).

Los extractos vegetales con propiedades alelopáticas son de fácil degradación en el control de las arvenses y se pueden obtener de tal manera que sean selectivos dentro de los cultivos, lo cual regula las cantidades demandadas por el mismo. La importancia de avanzar en el estudio de la actividad alelopática de extractos vegetales, se manifiesta en la disminución de los costos de mantenimiento de los cultivos y en la reducción del impacto ambiental que causa el uso de herbicidas (Macías, 2000; Ferguson y Rathinasabapathi, 2003).

La realización de este trabajo es una alternativa que contribuye al desarrollo de un herbicida específico para reducir los efectos negativos sobre el medio ambiente y el hombre (Velásquez et al., 2003). El estudio de la alelopatía brinda información de las especies de plantas de las que se pueden extraer compuestos activos, con el fin de realizar ensayos en campo que permitan la estandarización de

biopreparados. También es un estudio que puede ser usado como técnica para bioguiar la obtención de un compuesto aleloquímico durante su proceso de separación (Fukuhara et al., 2004; Restrepo y Galván, 2006).

Finalmente, con el desarrollo del presente estudio se pretende determinar el potencial alelopático de los extractos vegetales de diclorometano y de metanol, de plantas recolectadas en la RNB-LP, para contribuir en la búsqueda de nuevos agentes que eventualmente puedan actuar como herbicidas.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 ACTIVIDAD ALELOPÁTICA

Molisch fue el primero que empleó la palabra alelopatía que viene del griego *Allelon* = uno al otro y *pathos* = sufrir, para referirse a los efectos perjudiciales o benéficos, que directa o indirectamente, sufre una planta debido a la liberación de Metabolitos Secundarios (MS) o aleloquímicos provenientes de otra (Gonçalves, 2000).

La definición de alelopatía fue estandarizada por la Asociación Internacional de Alelopatía como: *"Cualquier proceso que involucre metabolitos secundarios producidos por las plantas, microorganismos, virus y hongos que influyan en el crecimiento y desarrollo de sistemas agrícolas y biológicos"* (Gonçalves, 2000).

Sin embargo, los compuestos aleloquímicos son considerados como las sustancias que pueden ser usadas para inhibir o estimular la germinación o el crecimiento de algunas semillas o plántulas. El estudio de los aleloquímicos se ha promovido como nueva alternativa para el control de los cultivos que se ven amenazados por la presencia de arvenses, las cuales compiten por espacio y nutrientes afectando la productividad de los mismos; este efecto competitivo es conocido como efecto detrimental y es negativo para el cultivo de interés. Algunos autores consideran que el efecto detrimental es alelopático si la actividad se debe a la segregación de MS (Ridenour, 2001; Rodríguez et al., 2002; Lu y Yanar, 2004).

El efecto alelopático que puede tener una planta sobre otra, puede ser positivo, cuando estimula el crecimiento normal; negativo, cuando se inhibe el crecimiento o nulo, cuando los aleloquímicos no tienen ningún efecto sobre el desarrollo de la planta; dichos efectos dependen del comportamiento de cada aceptor frente al

aleloquímico y de las propiedades tanto del aceptor como del aleloquímico (Krautmann et al., 2001; Waller et al., 1992).

Krautmann et al., (2001) demostraron como fracciones cromatográficas diferentes de la especie *Tridax procumbens* L. (Asteraceae), inhibían el crecimiento de semillas pregerminadas de *Lactuca sativa*. De esta manera se definió el efecto alelopático negativo.

Waller et al., (1992) evaluaron los extractos de las hojas de la especie *Vigna radiata* L. (Fabaceae) y encontraron actividad alelopática positiva sobre el crecimiento de la radícula de *L. sativa* y de *V. radiata*, al observar que las semillas crecieron más que en el testigo absoluto; con lo que se tuvo el concepto de efecto alelopático positivo, que fue atribuido a una saponina triterpénica.

La actividad alelopática se debe a la liberación de sustancias químicas (MS) o aleloquímicas producidas por las plantas las cuales actúan sobre otras especies, por medio de cuatro vías principales: volatilización, lixiviación, exudación radicular y descomposición de residuos vegetales, las cuales se ilustran en la figura 1 (Chicy y Kielbaso, 1998; Turk y Tawaha, 2003).

1.2 HERBICIDAS Y ALELOQUÍMICOS

Todos los herbicidas son tóxicos y contaminantes (Nivia, 2000), por lo cual, se requieren nuevas alternativas de control de arvenses, como las basadas en las propiedades inhibitorias de algunos MS contenidos en una planta (aleloquímicos), los cuales, pueden inhibir la germinación de las semillas y reducir el crecimiento; adicionalmente, estas nuevas medidas disminuyen el impacto ambiental (Maldonado, 2002).

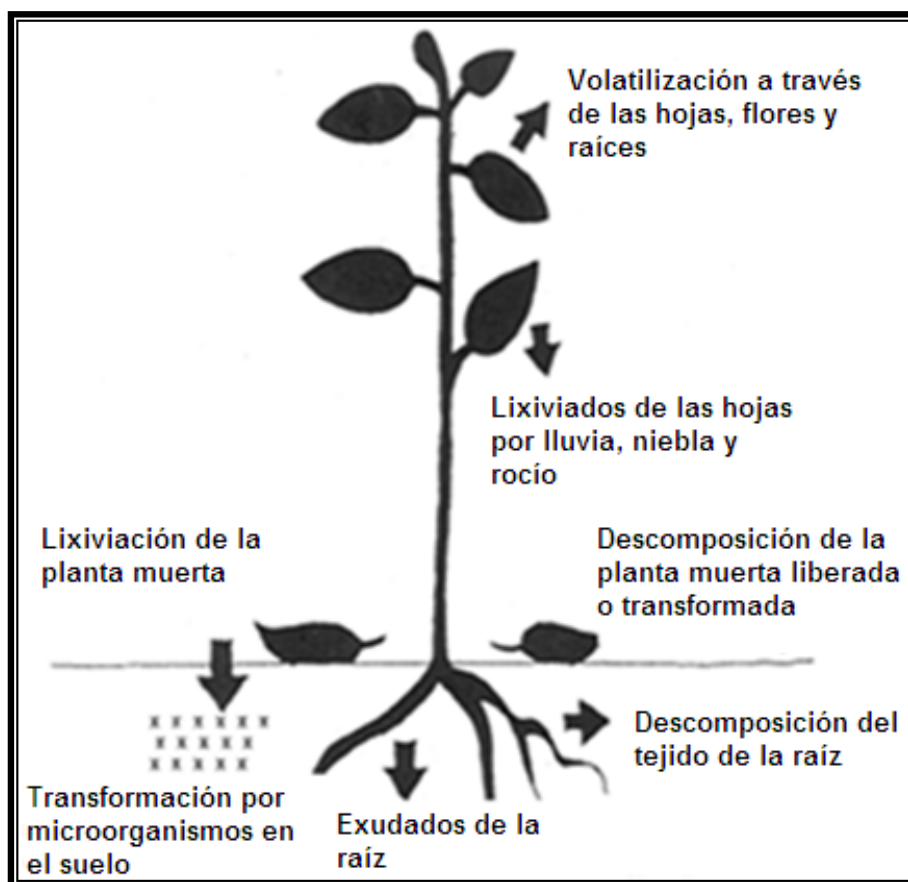


Figura 1. Vías de liberación de aleloquímicos al ambiente, por parte de una planta (Chicy y Kielbaso, 1998).

Por ejemplo, Krautmann et al., (2001) durante la separación del compuesto activo de las fracciones de *T. procumbens*, seleccionaron fracciones con presencia de lactonas, caracterizadas por su amplia actividad biológica; además, confirmaron el potencial herbicida de la fracción obtenida como alternativa favorable para el cultivo y el medio ambiente.

Por otra parte, la interacción de una planta con otra puede ser provechosa para la germinación o el crecimiento (Gonçalves, 2000), planteándose la asociación de cultivos como una medida ventajosa que puede brindar protección y favorecer el desarrollo de las especies relacionadas (Yokotani et al., 2003).

1.2.1 Núcleos fitoquímicos que presentan actividad alelopática

En la tabla 1, se muestran algunos núcleos fitoquímicos aislados que presentan propiedades alelopáticas y se muestran las estructuras de compuestos representativos de ellos. Entre los núcleos fitoquímicos están los glicósidos cianogénicos que tienen poder alelopático debido a que producen como resultado de su hidrólisis, ácido cianhídrico e hidroxibenzaldehído y este a su vez, produce después de su oxidación el compuesto tóxico ácido *p*-hidroxibenzoico. Otros compuestos son fenoles, derivados del ácido benzoico y del ácido cinámico, como los ácidos caféico, ferúlico, *p*-cumárico, y clorogénico; además, sesquiterpenlactonas, terpenoides, quinonas, coumarinas, flavonoides y taninos, presentan actividad alelopática frente algunas especies de semillas, entre las que se encuentra *L. sativa* (D'Abrosca, 2001; Macías et al., 1999).

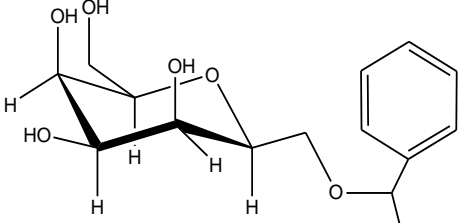
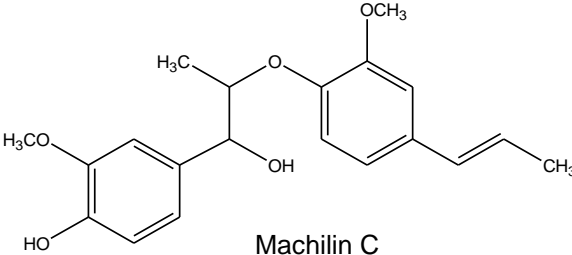
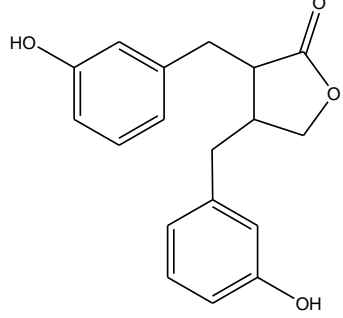
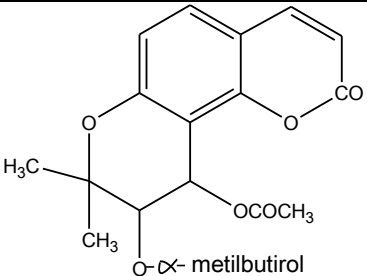
Las sesquiterpenlactonas han sido aisladas de familias como la Asteraceae, Umbelliferaceae, Lamiaceae y Magnoliaceae y presentan una actividad amplia como compuestos alelopáticos, citotóxicos, bactericidas y fungicidas, entre otros (Macías et al., 1999).

A su vez, los flavonoides interfieren en el proceso respiratorio de las mitocondrias, retardando el crecimiento de plantas (Macías et al., 1999).

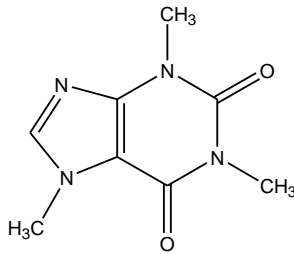
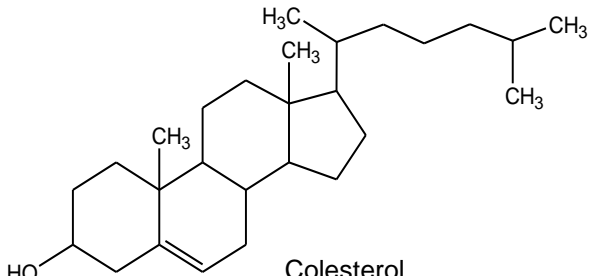
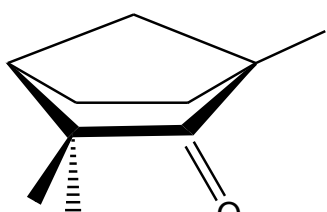
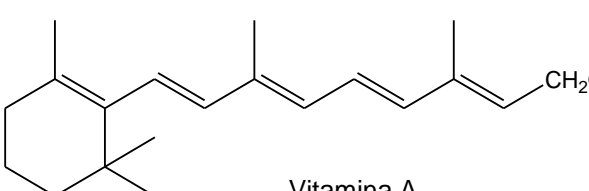
1.3 GERMINACIÓN

La germinación se desencadena cuando las semillas son tratadas con agua y el tegumento permite el paso de sustancias al interior de la misma, donde comienza la mitosis del embrión zigótico; el proceso biológico que se desarrolla en el embrión, permite la germinación de la semilla, el crecimiento y generación de tejidos (Jean-Yves et al., 2006).

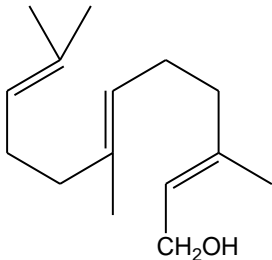
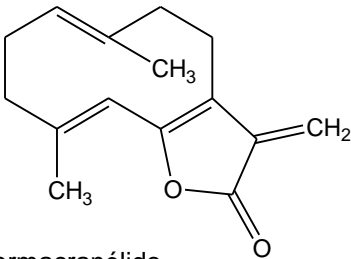
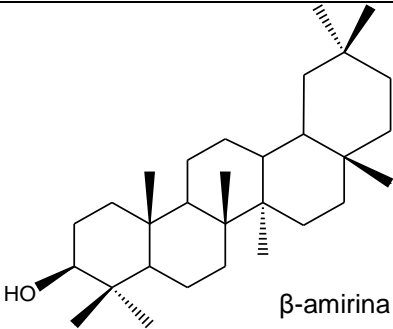
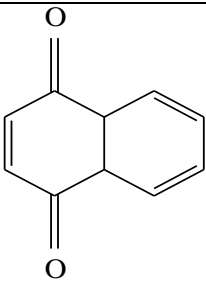
Tabla 1. Tipos de núcleos fitoquímicos que han presentado propiedades alelopáticas en el bioensayo con *Lactuca sativa*.

Núcleo fitoquímico	Ejemplo de núcleo fitoquímico	Acción característica	Referencia
Glicosidos cianogénicos	 <p>Vicianina</p>	Inhiben fuertemente la germinación de <i>L. sativa</i> .	D'Abrosca, (2001)
Neolignan	 <p>Machilin C</p>	Inhiben la germinación débilmente, pero estimulan el crecimiento de la raíz de <i>L. sativa</i> .	D'Abrosca, (2001)
Lignan	 <p>Enterolactona</p>	Inhiben la germinación débilmente, pero estimulan el crecimiento de la raíz de <i>L. sativa</i> .	D'Abrosca, (2001)
Coumarinas	 <p>Visnadina</p>	Intervienen en el proceso respiratorio e inhiben el crecimiento de las plantas.	Puente, (1999)

Continuación de **tabla 1.**

Núcleo fitoquímico	Ejemplo de núcleo fitoquímico	Acción característica	Referencia
Alcaloides	 <p>Cafeína</p>	Intervienen en procesos respiratorios e inhiben el crecimiento de las plantas.	Puente, (1999)
Esteroides	 <p>Colesterol</p>	Inhiben la germinación de <i>L. sativa</i> .	Macías, (1999)
Monoterpenos	 <p>Fencona</p>	Responsables del olor de muchas plantas que puede tener un efecto fitotóxico hacia otras.	Macías, (1999)
Diterpenos	 <p>Vitamina A</p>	Inhiben casi completamente la elongación de la raíz de <i>L. sativa</i> .	Macías, (1999); Gonçalves, (2000)

Continuación de **tabla 1.**

Núcleo fitoquímico	Ejemplo de núcleo fitoquímico	Acción característica	Referencia
Sesquiterpenos	 Farnesol	Se encuentran implicados en procesos alelopáticos que inhiben fuertemente la germinación de <i>L. sativa</i> .	Macías, (1999)
Lactonas sesquiterpénicas	 Germacranólido	Inhiben la germinación de <i>L. sativa</i> y tienen un efecto negativo sobre otras especies vecinas.	Macías, (1999); Krautmann, (2001)
Lupanos triterpenos	 β-amirina	Estimulan la actividad germinativa de <i>L. sativa</i> .	Macías, (1999)
Quinonas	 Juglona	Es tóxico para los cultivos, inhibiendo el crecimiento de las plantas.	Gajardo et al., (2004)

Para que el proceso de germinación ocurra es necesario que la semilla pase por tres fases (Jean-Yves et al., 2006), la fase de hidratación, la fase de germinación y la fase de crecimiento.

La fase de hidratación, es donde todos los tejidos internos absorben agua y la semilla aumenta su proceso respiratorio.

En la fase de germinación, se producen transformaciones bioquímicas y fisiológicas internas y se reduce el consumo de agua; dentro de esta fase se encuentran cuatro etapas como se ilustra en la figura 2, desde el brote de la radícula hasta la formación de la primera hoja.

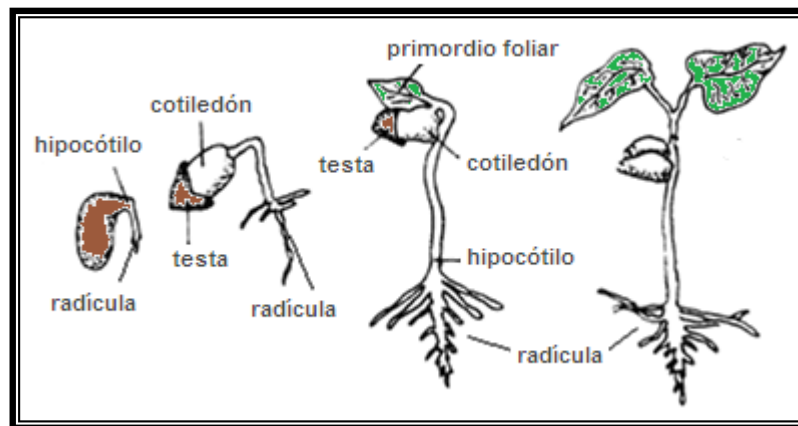


Figura 2. Etapas de la germinación de las dicotiledóneas, como la lechuga (Jean-Yves et al., 2006).

La última es la fase de crecimiento, en la cual se reactiva la absorción del agua, el proceso respiratorio y la fotosíntesis (Jean-Yves et al., 2006).

Todas esas fases son necesarias para la germinación de la semilla y cuando se alteran, las semillas pueden impermeabilizarse, evitando la entrada de sustancias (Bradford, 1995) o absorben gran cantidad de agua (hinchon) evitando su germinación (Zalacain et al., 2005).

La germinación puede ser afectada por sustancias aleloquímicas, que la inhiben o la favorecen. Ejemplos de las primeras sustancias son los alcaloides y coumarinas, porque interfieren en los procesos respiratorios, retardando el desarrollo de la planta (Lu y Yanar, 2004). Mientras que del segundo grupo de sustancias, los lupanos triterpénicos estimulan la actividad germinativa (Macías, 1999).

Por otra parte, la germinación de las semillas y su desarrollo rápido esta determinado por factores intrínsecos y extrínsecos; los intrínsecos son aquellos referentes a la madurez y la viabilidad de las semillas (García et al., 2001). Esta viabilidad depende de variaciones genéticas y determinan para una especie que algunas variedades puedan adaptarse mejor a unas condiciones que a otras (Moreno et al., 2001).

Mientras que, los factores extrínsecos están determinados por las condiciones ambientales, como la temperatura, la humedad relativa, la iluminación, entre otros; propiedades que pueden acelerar o retardar los procesos de crecimiento de las semillas (Bertín et al., 2001).

1.3.1 Interacción de los aleloquímicos en la germinación

Los MS con efecto alelopático (aleloquímicos) pueden tener naturaleza química variada (aromática o alifática) y ser de diferentes tamaños (ver tabla 1). Por eso, se espera que cada agente aleloquímico tenga un efecto diferente sobre las semillas o sobre las plántulas ya desarrolladas, atacando tejidos u órganos donde sea más probable su reacción, bajo condiciones apropiadas dependiendo su naturaleza (Varnero et al., 2006; Varnero et al., 2007; Kato-Noguchi y Tanaka, 2004).

Los agentes aleloquímicos causan diversos efectos sobre las plantas, al reaccionar o interferir con enzimas especializadas encargadas del ciclo celular, frenando los procesos normales de las células, el crecimiento de la semilla o plántula o estimulando el desarrollo de las mismas. Es decir que, estos compuestos pueden

desencadenar eventualmente la pérdida de la semilla o pueden acelerar su crecimiento una vez germinada (Lu y Yanar, 2004).

Waller et al., (1992) explicaron como las funciones enzimáticas en las raicillas podían ser alterada por aleloquímicos, inhibiendo el crecimiento de las plántulas. El mecanismo de acción propuesto consistió en el bloqueo del sitio activo de las enzimas en las células de la raíz, que regulan el ingreso del agua y nutrientes; a su vez, dichas enzimas evitan el ingreso de otras sustancias tales como las saponinas triterpénicas.

Las saponinas triterpénicas son agentes aleloquímicos que no contribuyen con los procesos metabólicos involucrados con el desarrollo de la planta; por lo cual, las enzimas de la raíz hidrolizan dicho aleloquímico hasta obtener la aglicona. Se presenta efecto inhibitorio cuando al aumentar la concentración del aleloquímico se bloquea la acción enzimática y se evita la liberación de la aglicona; por tal motivo, se obtiene frecuentemente mayor efecto inhibidor en la germinación o crecimiento de una planta a mayores concentraciones del aleloquímico.

1.4 BIOENSAYO DE ACTIVIDAD ALELOPÁTICA

El efecto de la actividad alelopática se puede cuantificar mediante un bioensayo *in vitro* y determinar su acción sobre la germinación y el crecimiento de las plántulas.

Rodríguez et al., (2002) cuantificaron el efecto de un grupo de plantas medicinales a través de un bioensayo de actividad alelopática al medir las longitudes radicales de las plántulas de albahaca (*Ocimum basilicum* L.). En las diferentes repeticiones del bioensayo, los crecimientos de las plántulas fueron menores y heterogéneos al del control, por lo cual para el análisis estadístico se elaboraron promedios de dicho parámetro de medición hasta concluir con un efecto inhibitorio sobre el crecimiento.

Otra de las consideraciones del bioensayo de actividad alelopática, es su uso no solo como identificador del efecto, sino también como técnica para el reconocimiento y aislamiento de aleloquímicos; por eso, la selección previa del material biológico a estudiar y emplear en el bioensayo es importante y es la vía para la obtención de herbicidas específicos (Macías, 2000). Por ejemplo Kato-Noguchi y Macías, (2005) a través de bioensayos con semillas de *L. sativa*, evaluaron progresivamente la acción del compuesto 6-metoxi-2-benzoxalinona, aislado por técnicas cromatográficas e identificado con el bioensayo alelopático en cada fraccionamiento.

Kato-Noguchi y Tanaka (2004), mostraron que el extracto obtenido de la cáscara de *Citrus junos* (Rutaceae) presentó mayor efecto inhibitor en la germinación de *L. sativa* (Asteraceae) que el presentado por los extractos provenientes de las otras partes de la planta. De esta manera aislaron el éster del ácido β -D-glucopiranosil abscísico, identificándolo como un aleloquímico potencial. Adicionalmente, el estudio estableció que en la búsqueda de agentes aleloquímicos, se debe hacer una selección correcta de la parte de la planta con mayor actividad alelopática.

1.4.1 Antecedentes metodológicos e importancia de *L. sativa*

Las especies de arvenses más comunes presentes en los cultivos pertenecen a las familias Asteraceae, Umbeliferaceae, Cruciferaceae, Solanaceae, Liliaceae y Graminaceae, todas tienen análogos que pueden ser adquiridas comercialmente y se presentan en la tabla 2. Esas especies fueron estudiadas por Macías et al., (1999) quienes recomendaron a dichas especies como aceptoras de agentes alelopáticos.

Tabla 2. Plantas receptoras a agentes alelopáticos (Macías et al., 1999).

	FAMILIA	PLANTA EVALUADORA
Dicotiledóneas	Cruciferaeae	<i>Lepidium sativum</i> L. (Berro)
	Asteraceae	<i>Lactuca sativa</i> L. (Lechuga)
	Solanaceae	<i>Lycopersicum esculentum</i> L. (Tomate)
	Umbeliferaceae	<i>Daucus carota</i> L. (Zanahoria)
Monocotiledóneas	Liliaceae	<i>Allium cepa</i> (Cebolla)
	Graminaceae	<i>Triticum aestivum</i> L. (Trigo)
		<i>Hordeum vulgare</i> L. (Cebada)
		<i>Zea mays</i> L. (Maíz)

La metodología usada para la realización del bioensayo *in vitro* de actividad alelopática puede variar como lo muestran los siguientes autores.

Kato-Noguchi et al., (2002a,b) realizaron la evaluación de la actividad alelopática de los extractos metanólicos de *C. junos* sobre 10 semillas de *L. sativa*. También, evaluaron el potencial de varios extractos a 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000 mmol/L, usando Tween 20 a 0.05% como control negativo realizanso las mediciones cada 36 y 60 horas; la temperatura y la intensidad de la luz también fueron controladas (exponiendo y ocultando las semillas).

Kato-Noguchi y Tanaka (2004), evaluaron los extractos de diferentes partes de la planta de *C. junos* a 0.1, 0.3, 1.0, 3.0, 10 y 30 mg/mL sobre semillas pregerminadas de *L. sativa*, empleando Tween 20 (0.05%) como control negativo.

Kato-Noguchi y Macías, (2005) evaluaron el potencial alelopático del compuesto 6-metoxi-2-benzoxalinona aislado de diferentes especies de la familia Graminaceae a concentraciones de 0, 0.001, 0.03, 0.1, 0.3, 1 y 3 mmol/L y su acción sobre la actividad de la α -amilasa presente en 25 semillas de *L. sativa*, las cuales fueron esterilizadas previamente con una solución de hipoclorito al 2%.

Chon et al., (2005) evaluaron por separado cuatro clases diferentes de extractos frente a 50 semillas germinadas de alfalfa (*Medicago sativa*, Fabaceae); se usó agua destilada estéril como control negativo y también se controló la intensidad de la luz en fotoperíodos de 14 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

D'Abrosca et al., (2001) aislaron 2 compuestos de *Sambucus nigra* (Caprifoliaceae) durante la determinación del efecto alelopático de extractos metanólicos de dicha especie sobre 30 semillas de *Pisum sativum*; las semillas se expusieron a fotoperíodos de 12 horas a 10.000 lux y terminado su período de crecimiento se congelaron a menos (-) 20°C hasta medir las longitudes radicales. Por su parte, Yang et al., (2002) evaluaron tres compuestos fenólicos a 25, 50 y 100 mg/L frente a 25 semillas pregerminadas de *Oryza sativa* (Poaceae), que fueron previamente esterilizadas empleando etanol al 70%, hipoclorito al 2% y finalmente enjuagadas con abundante agua destilada estéril.

Varnero et al., (2007) evaluaron los extractos de residuos orgánicos provenientes del compost frente a 10 semillas de *L. sativa* (Asteraceae) y 10 de *Raphanus sativus* (Cruciferaeae), usando como control negativo agua destilada estéril. Lu y Yanar (2004), evaluaron la actividad de 22 extractos de plantas sobre 50 semillas pertenecientes a 7 familias diferentes, entre las que se encontraba la especie *L. sativa*; las semillas fueron esterilizadas con hipoclorito-agua en una relación de 1:10, luego se embebieron en el extracto a evaluar, se dejaron secar, se pusieron a germinar y cada tres días, por un período de 21 días, se realizaron las respectivas mediciones del porcentaje de germinación de las semillas.

De las anteriores metodologías se pueden sacar factores predominantes, tales como el uso del hipoclorito al 2% para la esterilización de las semillas y el control de la intensidad luminosa, que fue continua durante los días de los experimentos elaborados en este trabajo. Estas consideraciones y otras se especifican en la metodología de este trabajo. A continuación, se analiza la importancia de *L. sativa*.

Macías et al., (2000) seleccionaron nueve variedades comerciales de semillas con base en antecedentes bibliográficos por ser sensibles frente a agentes externos, para evaluar la sensibilidad de las semillas frente a ocho herbicidas comerciales; la dicotiledónea más idónea para la evaluación fitotóxica fue *L. sativa*.

En el desarrollo del ensayo de la actividad alelopática se han empleado diversidad de semillas por otros investigadores, entre las cuales se encuentran la especie *L. sativa*, *R. sativus*, *Allium cepa* (Alliaceae), *O. basilicum* L (Lamiaceae) y *O. sativa*. A las semillas mencionadas se les evaluó el crecimiento y desarrollo frente a un extracto determinado; los resultados obtenidos permitieron concluir que dentro del grupo seleccionado *L. sativa* fue la que mostró mayor sensibilidad, elevado ritmo de crecimiento y de absorción de nutrientes (Aportela y González, 2001; Yang et al., 2002; Olaya, 2005).

En los experimentos realizados por D'Abrosca et al., (2001) se emplearon semillas de *L. sativa* para realizar análisis cuantitativos determinando la concentración letal media (CL₅₀) y la concentración de elongación media (CE₅₀) de los extractos evaluados; así mismo, en el estudio realizado por Gonçalves y Vieira, (2000) se emplearon semillas de *L. sativa* para realizar un análisis descriptivo. En ambos estudios los resultados obtenidos fueron satisfactorios, pues al comparar la longitud de la radícula de las plántulas tratadas con el control negativo, se obtuvo inhibición alta del crecimiento, lo que indica sensibilidad elevada de las semillas.

Varnero et al., (2007) evaluaron el comportamiento del rabanito (*R. sativus*) y de la lechuga (*L. sativa*), demostrando que *R. sativus* presentó mayor sensibilidad a sustancias fitotóxicas. El medio en el cual crecieron ambas semillas tenía residuo de compost en su fase de maduración; pero en un ensayo previo, realizado por Varnero et al., (2006) con los mismos residuos en una etapa de maduración diferente, *L. sativa* mostró mayor sensibilidad que *R. sativa*.

La especie *L. sativa* longifolia algunas veces es conocida como Cos, Roman lettuce, Manchester lettuce, se caracteriza por presentar crecimiento rápido, homogéneo y por ser sensible a los aleloquímicos, adaptarse fácilmente a las condiciones de trabajo, ser viable en períodos largos de tiempo y alcanzar un desarrollo temprano (Macías et al., 2000; Varnero et al., 2006).

Para la determinación previa de la actividad de los extractos vegetales, no se requieren consideraciones diferentes a las mencionadas anteriormente, pero para obtener un extracto que actúe sobre una especie específica, se deben seleccionar las semillas que tengan mayor similitud con las arvenses presentes en el cultivo, con la finalidad de inhibir contundentemente su germinación.

Macías et al., (1999) demostraron que las semillas de *L. sativa* son las indicadas para la detección de aleloquímicos. Otros autores como Varnero et al., (2006) también concuerdan con el empleo de éstas semillas como buenas aceptoras.

De acuerdo a los anteriores resultados y consideraciones, *L. sativa* es la especie apropiada para ser usada en bioensayos de alelopatía como aceptora de sustancias fitotóxicas. Por esto estas semillas se emplearon en este estudio para identificar el potencial alelopático del grupo de extractos de plantas recolectadas en la Reserva Natural Bremen-La Popa (Filandia-Colombia).

1.5 ZONA DE ESTUDIO: RESERVA NATURAL BREMEN-LA POPA (RNB-LP)

La RNB-LP está ubicada entre los 1.500 y 2.100 m de altitud sobre la vertiente occidental de la cordillera Central de los Andes Colombianos, entre los municipios de Filandia y Circasia (Quindío) como se ilustra en la figura 3. Esta Reserva cuenta con 411 ha de plantaciones maderables de pino pátula y ciprés. Adicionalmente, existen 336 ha de bosque nativo con plantas que poseen propiedades curativas e industriales que esperan ser estudiadas (Lloyla y Estrada, 2005). La RNB-LP hace

parte de la ventana 1 establecida por el Centro de Investigaciones y Estudios de Biodiversidad y Recursos Genéticos (CIEBREG).

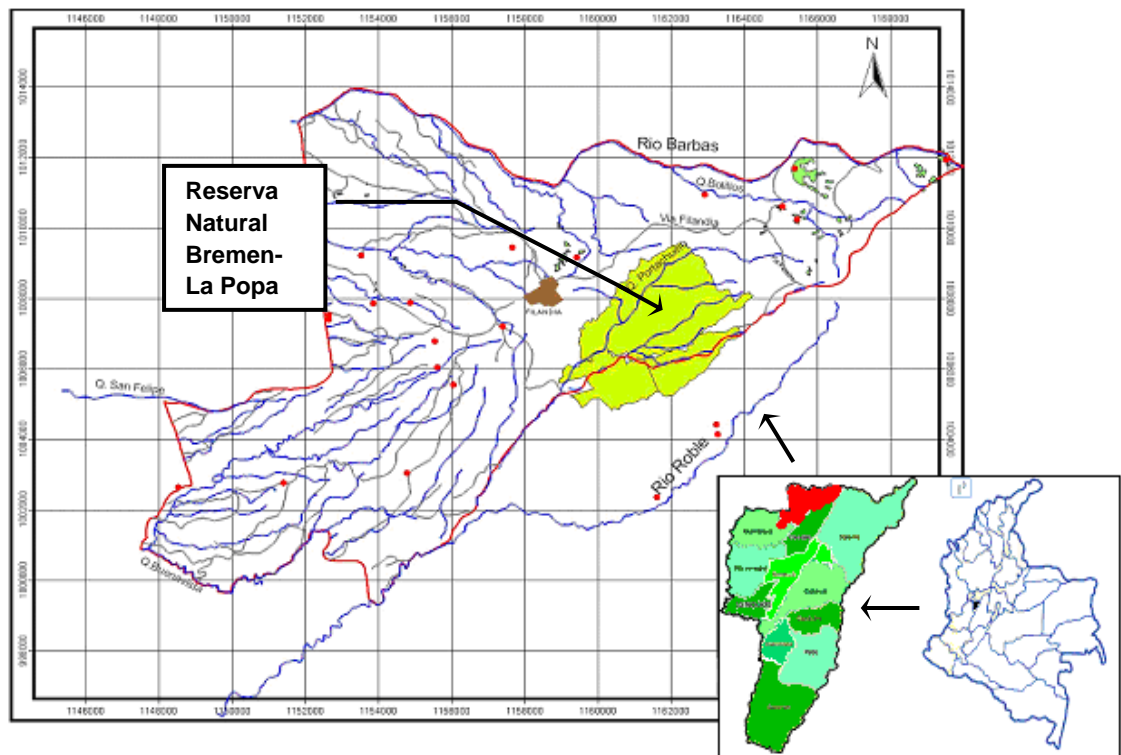


Figura 3. Reserva Natural Bremen-La Popa (Filandia-Quindío-Colombia), en amarillo. Ventana 1 del CIEBREG (CRQ, 2007).

1.6 DESCRIPCIÓN DE LAS PLANTAS EN ESTUDIO

Las plantas recolectadas hacen parte de un grupo de familias que se caracterizan por presentar diversas actividades biológicas sobre plantas, microorganismos, insectos, animales o por demostrar cierto carácter medicinal. Las especies que fueron estudiadas en este trabajo pertenecen a las familias Apocynaceae, Asclepiadaceae, Asteraceae, Euphorbiaceae, Rubiaceae y Solanaceae, las cuales se describen a continuación y se mencionan algunas actividades reportadas para algunas especies en particular.

1.6.1 Familia Apocynaceae

Está constituida por bejucos que crecen sobre arbustos o matorrales en rastrojos o en bosques secundarios. Presentan inflorescencia indefinida racemosa o definida cimosa, también se caracteriza por tener abundante látex y sus frutos pueden ser en baya o en folículo con semillas ariladas o plumosas (Mendoza y Ramírez, 2000).

Un ejemplo de esta familia es la especie *Voacanga africana*, cuya administración oral de 500 hasta 750 mg/kg inhibieron la formación de lesiones gástricas en ratas. Este resultado permitió elaborar un fitopreparado para la cura de úlceras en personas (Tan, 2000).

En el estudio sobre la determinación de actividad alelopática realizado por Lu y Yanar (2004), se encontró un efecto positivo de los extractos de *Nerium oleander* L. (Apocynaceae) al estimular el crecimiento de plantas de maíz y también al disminuir el crecimiento de las arvenses que atacan este cultivo, lo que posibilitó la preparación y estandarización de herbicidas de origen botánico.



Figura 4. *Adenium multiflorum* (Apocynaceae).

1.6.2 Familia Asclepiadaceae

Son plantas herbáceas, lianas, arbustos y árboles ocasionalmente, que crecen en zonas despejadas, bosques en regeneración y raras veces en bosques maduros. La inflorescencia es cimosa en cabezuela o capítulo. El fruto es en cápsula indehisciente pequeña similar a un filamento (Mendoza y Ramírez, 2000).

García, (1992) anotó que la decocción de la especie *Hoya carnososa* (Asclepiadaceae) se usa para controlar las inflamaciones; además, su látex es tóxico y narcótico ayuda a controlar la bronquitis y la neumonía. Gallego y Cardona, (2002) en uno de sus experimentos sobre las arvenses representativas en el cultivo del banano, determinaron que la aspersión del extracto de la especie *Sarcostema glaucum* (Asclepiadaceae) podía controlar el crecimiento de arvenses adultas que compiten por el agua.



Figura 5. *Ceropegia sandersonii* (Asclepiadaceae).

1.6.3 Familia Asteraceae

Son hierbas, lianas, arbustos o árboles, que se encuentran en zonas despejadas, bosques en regeneración y pocas veces en bosques maduros. Esta familia es muy variada, por lo que existen características vegetales específicas similares a las que presentan especies de otras familias, por consiguiente hay que seleccionarlas con

mucha rigurosidad. Una característica general es la presencia de inflorescencia de una o más cabezuelas o capítulos con una o más flores sésiles, sobre un receptáculo común (Mendoza y Ramírez, 2000).

De esta familia se tienen varios estudios que determinan su potencial alelopático como una fuente importante de MS en el control de arvenses en los cultivos; según el estudio realizado por Xuan et al., (2005) las especies *Eupatorium canabium* L., *Bidens pilosa* y *Pluchea indica*, presentaron un porcentaje de inhibición de 64.5, 50.0 y 0.9% respectivamente, en el crecimiento del cultivo de arroz.



Figura 6. *Heterotheca mariana* (Asteraceae).

De la familia Asteraceae se han identificado arvenses asociadas al cultivo de arroz (*O. sativa*) con actividad alelopática positiva, debido a la presencia de sesquiterpenlactonas; también se ha detectado efecto alelopático por parte de la especie *Encelia farinosa*, debido a la liberación de 3-acetil-6-metoxi-benzaldehído durante el proceso de descomposición de las hojas; la especie *Parthenium argentatum* libera ácido cinámico a través del exudado radicular, el cual inhibe el crecimiento de plantas aledañas (Murillo, 2006).

El estudio realizado por Krautmann et al., (2001) reveló que las fracciones de la especie *T. procumbens* (Asteraceae) inhibieron el crecimiento de *L. sativa*.

Acanthospermum pernum Australe (Asteraceae) cuyo nombre vulgar es yerba del cáncer, lo combate aplicándose en paños o cataplasmas sobre el lugar afectado y para tratar las úlceras malignas mediante la decocción de toda la planta macerada; la yerba del cáncer también tiene propiedades diaforéticas, depurativas y astringentes (García, 1992).

1.6.4 Familia Euphorbiaceae

Generalmente las plantas de esta familia son hierbas, arbustos o árboles de bosques secundarios o maduros, producen látex lechoso o coloreado, flores cimosa, racimosa o espigada que generalmente se presentan en ciatio (inflorescencia con un grupo de flores monandras y una sola flor femenina en posición central y largamente pedicelada, entorno al grupo de flores hay otro de brácteas, que forman un involucre en cuatro gruesos nectarios en el borde). Su fruto se presenta en cápsula o drupa (Mendoza y Ramírez, 2000).

A la familia Euphorbiaceae pertenecen especies como la yuca (*Manihot esculenta*), el higuerillo (*Ricinus communis*), entre otras especies ornamentales y comestibles. De esta familia se usa el aceite de la especie *Caryodendron orinocense*, por su parecido con el de oliva, dicho aceite se emplea para el control de algunas enfermedades epidérmicas, pintando la zona afectada; el aceite de esta especie es considerado un laxante suave (García, 1992).

De esta familia las especies *Euphorbia hirta*, *M. esculenta* y *R. communis*, presentan actividad alelopática en el cultivo de arroz, inhiben el crecimiento en un 37.4, 24.9 y 4.5% respectivamente (Xuan et al., 2005).



Figura 7. *Croton capitatus* (Euphorbiaceae).

1.6.5 Familia Rubiaceae

En esta familia existen árboles, arbustos, hierbas o lianas, terrestres o epífitas, que crecen en todo tipo de hábitat. Poseen hojas opuestas y simples. Flores perfectas o unisexuales. El fruto puede ser una drupa, baya o una cápsula. Esta familia se puede confundir con otras que se caracterizan por tener hojas opuestas con estípulas, como la familia Urticaceae y Cunoniaceae, pero se diferencia por que el borde de las hojas es liso (Mendoza y Ramírez, 2000).



Figura 8. *Mitchella repens* (Rubiaceae).

La familia Rubiaceae tiene algunas especies muy representativas como el café (*Coffea arabica* L.). Esta familia se caracteriza por tener especies con propiedades

medicinales y estimulantes, también hay una amplia variedad de especies ornamentales que crecen en sectores tropicales (Mendoza y Ramírez, 2000; García, 1992).

Artavia et al., (2004) evaluaron la especie *Duroia hirsuta*, en una zona que se caracterizó por presentar vegetación homogénea, debido al fuerte efecto alelopático en contra de otras plantas que crecían a su alrededor. Sin embargo, este estudio detectó un mutualismo entre colonias de hormigas y la especie *D. hirsuta*, las cuales habitaban en sus ramas; este comportamiento muestra como la producción de MS por esta especie afecta el crecimiento de plantas aledañas y a su vez, generan un medio apropiado para el hábitat de las hormigas, que como lo definió la Asociación Internacional de Alelopatía (Gonçalves et al., 2000) se puede considerar como un efecto alelopático, si el mutualismo se debe a la liberación de sustancias por parte de *D. hirsuta*.

1.6.6 Familia Solanaceae

Las plantas de esta familia se pueden encontrar como hierbas, lianas, arbustos o árboles pequeños, terrestres o epífitas, las cuales crecen en el interior de los bosques o en zonas abiertas; poseen pelos estrellados y algunas veces tiene espinas, su inflorescencia es cimosa, con frutos en baya o algunas veces en cápsula; sus especies se caracterizan por biosintetizar alcaloides.

Especies como el borrachero (*Brugamsia aurea*) y la dama de noche (*Cestrum nocturnum*), se caracterizan por ser venenosas y alucinógenas, debido a la producción de alcaloides como la escopolamina, que causa mareos, alucinaciones y pérdida del conocimiento. La escopolamina es el alcaloide producido en mayor proporción por la dama de noche y la causa principal de los trastornos (Buznego, 2005).



Figura 9. *Solanum carolinense* (Solanaceae).

Las especies de la familia Solanaceae tienen varios efectos sobre personas, como es el caso de *Solanum elaeagnifolium* (tomatillo) que es diurético, estornutatorio y sustituto del jabón. *Capsicum chacoense* (ají del monte) tiene propiedades hepáticas, rubefascentes y antirreumáticas. *Fabiana imbricata* (romero pichi) es diaforético, diurético y astringente. También la especie *Petunia axillaris*, (tabaco indio) tiene efectos narcóticos y es venenosa (Vitto et al., 1997). Cabe resaltar que de la familia Solanaceae se han domesticado varias especies que son muy importantes en la dieta diaria, como son lulo, tomate, berenjena, ají, papa entre otros.

Rodríguez et al., (2002) encontraron al evaluar la actividad alelopática de *Sorghum halepense* que inhibía la elongación de la radícula del tomate (Solanaceae).

Hasta ahora se ha hecho una descripción de la actividad alelopática que manifiestan algunas de las especies de las familias estudiadas en el presente trabajo, también se han mencionado algunas características medicinales con la finalidad de resaltar las propiedades curativas e industriales de las familias de plantas recolectadas; es decir, que aunque no se encuentran amplios antecedentes alelopáticos, la actividad biológica de alguna manera está relacionada con la posible presencia de compuestos alelopáticos. Se analizaron

los antecedentes de la actividad alelopática que presentaron las familias, debido a que no se encontró información amplia y específica de las especies recolectadas para este estudio.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El control de arvenses por herbicidas es importante para frenar su propagación y mantener la productividad de un cultivo.

Las arvenses desarrollan diferentes mecanismos de protección frente a los herbicidas de amplio espectro (de acción múltiple sobre las malas hierbas), desarrollando resistencia que conlleva al aumento en la dosificación del herbicida para igualar el efecto inicial (Macías, 2000) y también se aumenta el costo de control de arvenses al tener que modificar constantemente los agentes herbicidas en un cultivo.

Por otra parte, herbicidas como el "Roundup", "Sting", "Endotal" (BSI) y "Endotal" (WSSA), tienen en común al Glifosato como compuesto activo, el cual según Labrada et al., (1996) es de baja toxicidad; sin embargo, el estudio realizado por Hultberg, (2007) mostró los efectos nocivos para el hombre al detectar que el Glifosato a 100 $\mu\text{g/L}$ disminuyó la concentración de cisteína en las células evaluadas, así como el Glutathión. El Glutathión ayuda a disminuir la aparición y crecimiento de diferentes tipos de cáncer, por lo que se considera una sustancia importante en el cuidado de la salud. A su vez, se evaluó la concentración de Glifosato en la orina y encontró que fue de 233 $\mu\text{g/L}$, la cual fue más del doble de la concentración con la que se determinaron los anteriores efectos nocivos, por lo que se demuestra además su fuerte acción sobre el hombre.

Estas observaciones muestran el impacto generado por el Glifosato sobre la población y la importancia de intensificar las investigaciones relacionadas con la obtención de compuestos alelopáticos de origen botánico, que frenen los efectos que presentan los herbicidas de amplio espectro.

La problemática de salubridad afecta a personas y animales, deteriora los recursos hídricos y la calidad del suelo, debido a la poca degradación de los herbicidas (Sánchez et al., 2005) y al manejo inadecuado de los mismos (Decreto No. 1443).

Este trabajo pretende contribuir a la investigación de la flora silvestre de nuestra región, en la búsqueda de plantas de las que se podrían obtener herbicidas de origen botánico, los cuales se espera sustituyan a los sintéticos de amplio espectro, ayuden a mitigar los problemas de salud pública y reduzcan el deterioro del ecosistema (Ferguson y Rathinasabapathi, 2003).

3. JUSTIFICACIÓN

El estudio de los MS de plantas que presentan actividad alelopática, puede contribuir a la obtención de sustancias que sirvan como alternativas para el control selectivo de las arvenses en los cultivos. Además, los compuestos aleloquímicos aislados de extractos vegetales pueden ser agentes herbicidas potenciales que reduzcan el efecto nocivo sobre el medio ambiente, por ser sustancias de fácil degradación.

Las plantas recolectadas en la RNB-LP, con las que se cuenta para el desarrollo de este trabajo, no tienen antecedentes que muestren su actividad alelopática, por esta razón y como lo aseguran Ferguson y Rathinasabapathi, (2003) se deben realizar diferentes determinaciones para aumentar el conocimiento de las diferentes actividades biológicas presentadas por las especies sometidas a evaluación. Además, este estudio es el inicio para la obtención de diferentes agentes herbicidas que puedan ser usados en un cultivo.

Por otra parte, la aplicación de una técnica basada en la alelopatía para el control de arvenses resulta en algunos casos viable económicamente, pues el cultivador tiene la posibilidad de obtener biopreparados caseros efectivos, a partir de las especies activas frente al bioensayo de alelopatía *in vitro* (Macías, 2000; Naumov, 1997).

Debido a la poca eficiencia de los herbicidas utilizados actualmente y a los problemas toxicológicos que ellos causan, con este trabajo se busca contribuir al desarrollo de herbicidas selectivos de origen botánico, a partir de la identificación de aleloquímicos (Rodríguez et al., 2002; Ferguson y Rathinasabapathi, 2003), mediante un tamizaje de las plantas recolectadas.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Determinar la actividad alelopática de los extractos vegetales de plantas recolectadas en la **Reserva Natural Bremen-La Popa** (RNB-LP, Filandia-Quindío-Colombia) y los posibles núcleos fitoquímicos responsables de este efecto, que permitan seleccionar las especies que tengan potencialidades como herbicidas.

4.2 Objetivos específicos

- Obtener extractos con solventes de diferentes polaridades (*n*-Hexano, Diclorometano, Metanol) de plantas recolectadas por el Grupo de Biotecnología-Productos Naturales (GB-PN) en la RNB-LP.
- Realizar el bioensayo de actividad alelopática *in vitro* con semillas de lechuga (*Lactuca sativa*) para identificar de los extractos de diclorometano y metanol, de las plantas recolectadas, cuales presentan la máxima inhibición de las semillas.
- Caracterizar los núcleos fitoquímicos presentes en los extractos de diclorometano y de metanol de las plantas recolectadas en la RNB-LP a través de la realización de una marcha fitoquímica y determinar los posibles MS causantes de la actividad alelopática.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 ESPACIO DISPONIBLE PARA LA REALIZACION DEL BIOENSAYO

El bioensayo *in vitro* de actividad alelopática se realizó en las instalaciones del laboratorio del Grupo de Biotecnología Productos Naturales (GB-PN) de la Escuela de Tecnología Química, de la Universidad Tecnológica de Pereira, sede la Julita, municipio de Pereira, cuya temperatura promedio es de 22°C, humedad relativa del 80%, precipitación promedio de 2400 mm/año y una altura de 1340 msnm.

5.2 MATERIALES

5.2.1 Reactivos. Hipoclorito de sodio (comercial), Tween 20 (SIGMA), Glifosato (Agrogen 488SL, FADA S.A.), diclorometano analítico (Mallinckrodt) y etanol al 70% (comercial).

5.2.2 Equipos. Se utilizaron micropipetas Eppendorf de 10-100 y 100-1000 μL , cámara de flujo laminar (Purificación y análisis de Fluidos Ltda.), estéreo microscopio (Carl Zeiss/Jena), cámara fotográfica (Cannon), pie de rey (Cienceware).

5.2.3 Material vegetal. Semillas de lechuga (*Lactuca sativa*) Batavia (Semillas Guerrero), extractos de diclorometano y de metanol de plantas recolectadas en la RNB-LP.

5.3 MÉTODOS

5.3.1 Obtención de los extractos. Las plantas recolectadas fueron sometidas a extracción en el laboratorio del GB-PN, siguiendo la metodología descrita en Niño et al., (2007) como se ilustra en la figura 10.

5.3.2 Selección de los extractos a estudiar. Se seleccionó un grupo de especies que están siendo evaluadas por el GB-PN para ampliar y fortalecer la investigación de sus características y efectos biológicos sobre la broca del café y la Sigatoka negra causados por *Hypothenemus hampei* Ferrari y *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, respectivamente.

5.4 CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA DE LOS EXTRACTOS

La marcha fitoquímica se realizó con cromatofolios de aluminio (Merck) de sílica gel 60 F₂₅₄.

La detección de los núcleos fitoquímicos presentes en los diferentes extractos crudos, se realizó a través de una marcha fitoquímica por cromatografía de capa delgada (TLC) para cada extracto, siguiendo la metodología descrita por Stahl, (1969) y utilizando los patrones eluentes y reveladores presentados en la tabla 3 y 4.

Tabla 3. Patrones utilizados en cromatografía de capa delgada (TLC) para la detección de núcleos fitoquímicos.

Núcleo fitoquímico	Patrón (2000 mg/L)	Revelador
Alcaloides	Papaverina	Dragendorff
Terpenos	Taxol y lanosterol	Anisaldehído/ CH ₃ COOH-H ₂ SO ₄
Triterpenos		
Esteroides		
Flavonoides	Kaempferol	AlCl ₃ al 2% en EtOH absoluto
Taninos	Acido gálico y ácido tánico	FeCl ₃ al 5% en solución salina saturada
Fenoles		
Saponinas esteroidales y triterpénicas	Diospolisaponina A y Digitonina	Vainillina 1% en EtOH-H ₂ SO ₄
Sesquiterpenlactonas	Digitoxina	Ácido 3,5-dinitrobenzónico-MeOH-KOH

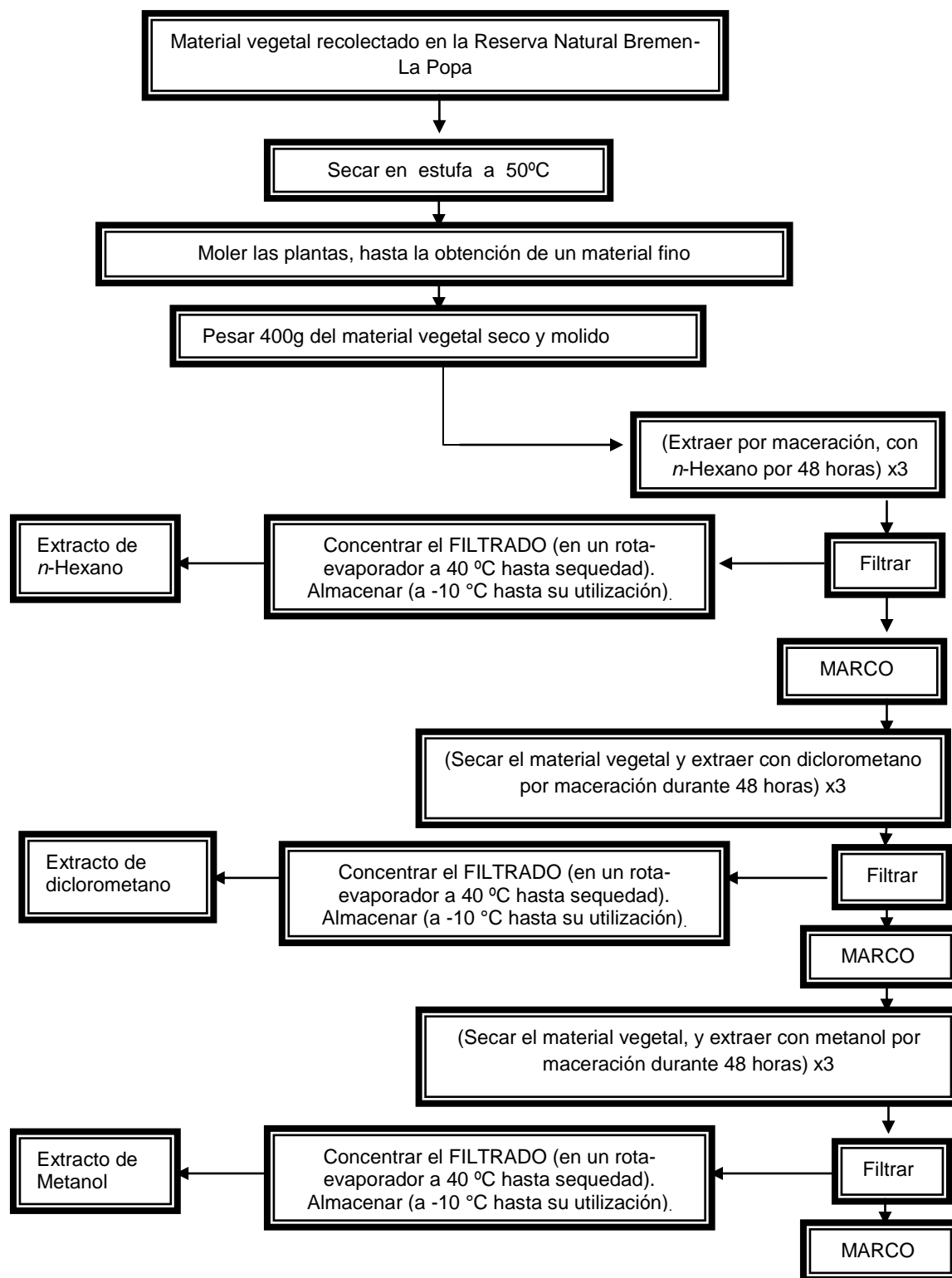


Figura 10. Etapas para la obtención de extractos vegetales (Niño et al., 2007).

Tabla 4. Eluentes usados para la elución de extractos.

Extracto	Eluente	Composición
<i>n</i> -Hexano	<i>n</i> -Hexano:AcOEt	(85:15)
Diclorometano	<i>n</i> -Hexano:AcOEt	(70:30)
Metanol	AcOEt:MeOH:H ₂ O	(100:13.5:10)

5.5 ENSAYO DE ACTIVIDAD ALELOPÁTICA

El bioensayo de actividad alelopática in vitro, se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita por Kato-Noguchi et al., (2002a,b), cuyas etapas básicas se describen en la figura 11. La línea punteada indica que la operación se realizó bajo condiciones estériles.

5.5.1 Preparación de semillas. Las semillas de *L. sativa* se esterilizaron con una solución de hipoclorito al 2% durante 15 minutos, luego se enjuagaron con abundante agua destilada estéril antes de ser utilizadas. Posteriormente se depositaron 15 semillas en cada Unidad Experimental (UE).

5.5.2 Preparación de soluciones patrones. Se prepararon soluciones patrón de los extractos de metanol y de diclorometano a 2000 y 1000 mg/L, con agua destilada y diclorometano, respectivamente como solventes. Para obtener las concentraciones de 500, 125 y 31.25 mg/L se tomaron alícuotas de las soluciones patrones iniciales y se diluyeron hasta obtener la concentración necesaria al momento de realizar el bioensayo. En cada ensayo se adicionó 1.6 mL del respectivo extracto a la concentración necesaria en su correspondiente UE, como se describe en el numeral 5.5.4.

5.5.3 Preparación de controles:

Control positivo: se utilizó una solución de Glifosato a 50 mg/L. se adicionó 1.6 mL del control a sus respectivas UE.

Control negativo: se utilizó agua destilada estéril. Se transfirieron 1.6 mL del control a la respectiva UE.

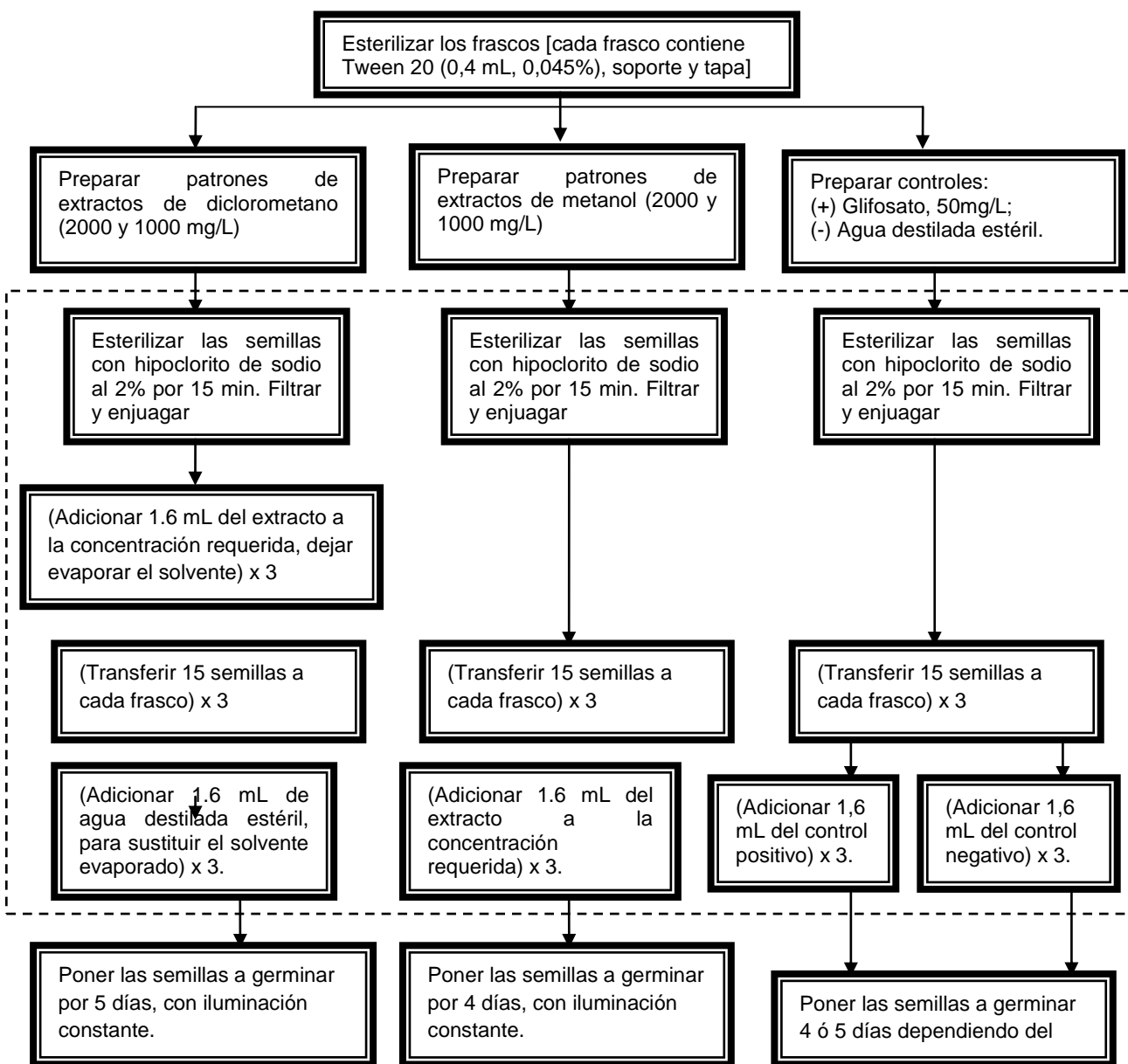


Figura 11. Procedimiento para la realización del bioensayo de actividad alelopática.

5.5.4 Descripción de la unidad experimental (UE). La Unidad Experimental (UE) del bioensayo *in vitro* de actividad alelopática, consistió en un frasco de vidrio de 125 mL de capacidad, al cual se le adicionó 0.4 mL de solución al 0.045% de Tween 20, un disco de papel filtro (soporte) y una tapa de aluminio como sellante del frasco, todas las UE antes de cada ensayo fueron esterilizadas. El conjunto anteriormente descrito y 1.6 mL de sustancia a estudiar es una UE. En la figura 12, se observan algunas UE en un ensayo.



Figura 12. Unidad Experimental (UE) empleadas para el bioensayo de actividad alelopática.

5.6 ANÁLISIS DE DATOS

Todos los experimentos se realizaron por triplicado con dos repeticiones efectuadas en fechas diferentes. La figura 12 muestra las UE empleadas para la realización del bioensayo de actividad alelopática *in vitro*, cada una de las cuales contiene 15 semillas, 45 por ensayo y concentración.

5.6.1 Toma de datos: Los datos de la cantidad de semillas de *L. sativa* tratadas con los extractos de diclorometano que germinaron, fueron tomados cada día durante 4 días y los de metanol se tomaron cada día durante 5 días. Finalizado cada período se determinó el Porcentaje de Germinación Relativo (PGR) para cada extracto y concentración.

El Crecimiento Promedio de Radícula (CPR) se calculó a partir de las mediciones de las longitudes de las radículas de cada semilla, utilizando un calibrador como escala de medición. Las mediciones se realizaron empleando el software Photoshop versión 9.0. Las plántulas se extendieron sobre una cartulina negra, la cual se rotuló especificando la concentración del extracto evaluado y su código UTP. En la figura 13 se ilustra el conjunto de semillas germinadas al ser tratadas con el extracto de diclorometano a 1000 mg/L de la especie *Lepidaploa lehmannii* (UTP-135, Asteraceae). Se utilizó un calibrador para determinar a cuantas unidades del programa equivale 1 mm y hacer la conversión para tener la longitud real de las plántulas. A cada conjunto se le tomaron entre 3 y 4 fotos y los archivos se guardaron en una carpeta con el día de finalización del experimento.

5.6.2 Porcentaje de Germinación Relativo (PGR)

Es una determinación que relaciona el número de semillas germinadas con el número total de semillas utilizadas en cada UE por cien. Se expresa mediante la ecuación 1:

$$\text{PGR(\%)} = \frac{\text{Semillas germinadas}}{\text{Semillas totales}} \times 100 \quad (1)$$

La ecuación 1 permitió obtener los datos de los PGR en cada UE. Con estos datos se obtuvo un valor promedio del PGR para cada extracto evaluado por triplicado con su repetición (Varnero et al., 2007).

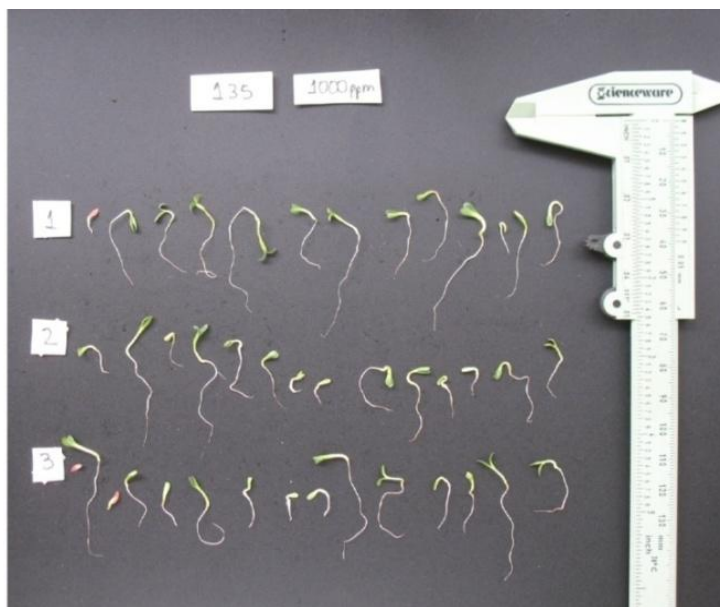


Figura 13. Plántulas de *L. sativa* germinadas frente al extracto de diclorometano de la especie *Lepidaploa lehmannii* (UTP-135, Asteraceae) a 1000 mg/L.

5.6.3 Crecimiento Promedio de Radícula (CPR)

El CPR es el resultado de la sumatoria de las mediciones de la longitud de las plántulas, dividido entre la cantidad de semillas germinadas que fueron tratadas con los diferentes extractos. La ecuación 2, conlleva a la obtención de dichos valores.

$$\text{CPR} = \frac{\sum_{i=1}^{90} x_i}{n} \quad (2)$$

Donde:

x, es la longitud radicular de una semilla germinada, frente a una concentración determinada de un extracto y **n**, es el número total de semillas germinadas, a las cuales se les midió la longitud, que puede ir desde 0 a 90 semillas, por extracto a una concentración dada. Se utilizaron 45 semillas en un experimento, 90 con su respectiva replica.

Después de haber obtenido los valores de PGR y CPR, se calculó el Índice de Germinación (IG) que permitió seleccionar los extractos con actividad alelopática.

5.6.4 Índice de germinación (IG)

El IG se define como el producto del PGR y del CPR sobre 100, como se ilustra en la ecuación 3 (Varnero et al., 2006):

$$IG = \frac{PGR \times CPR}{100} \quad (3)$$

Los cálculos del PGR, CPR e IG, se realizaron a través de Microsoft Excell 2007.

Los extractos activos fueron seleccionados de acuerdo a los criterios descritos en la figura 14, en donde se tomaron como activos los extractos que lograron inhibir la germinación de las semillas; la finalidad de este trabajo es el inicio a la posible obtención de aleloquímicos los cuales puedan en el mediano futuro ser desarrollados como herbicidas para el control de arvenses.

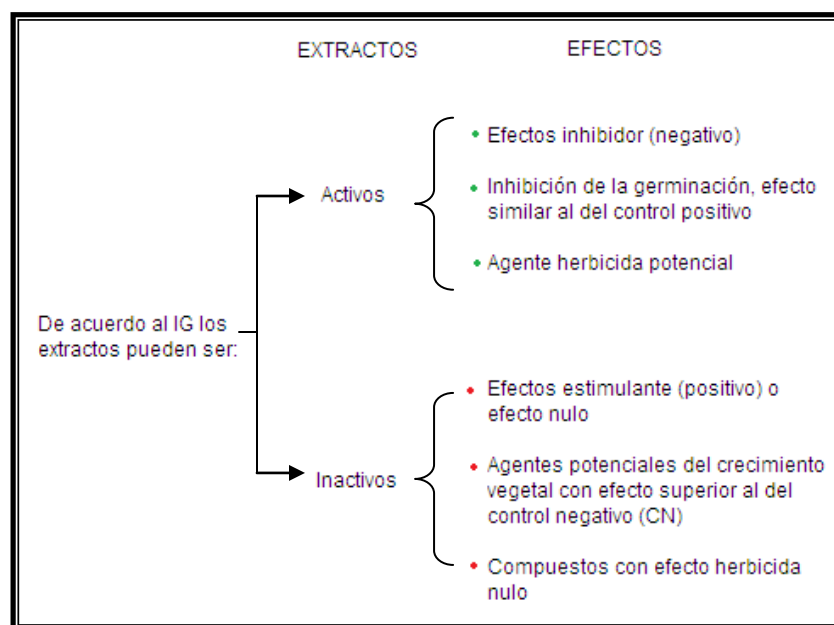


Figura 14. Criterios para la selección de los extractos activos e inactivos.

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.5 RECOLECCIÓN DE PLANTAS Y EXTRACTOS OBTENIDOS

Las plantas estudiadas se recolectaron en la Reserva Natural Bremen-La Popa (RNB-LP), entre el 22 al 24 de agosto del 2005, por el Grupo de Biotecnología-Productos Naturales (GB-PN) de la Universidad Tecnológica de Pereira, con el apoyo del CIEBREG (ventana 1). En la figura 15 se muestran los sitios de recolección de las plantas.

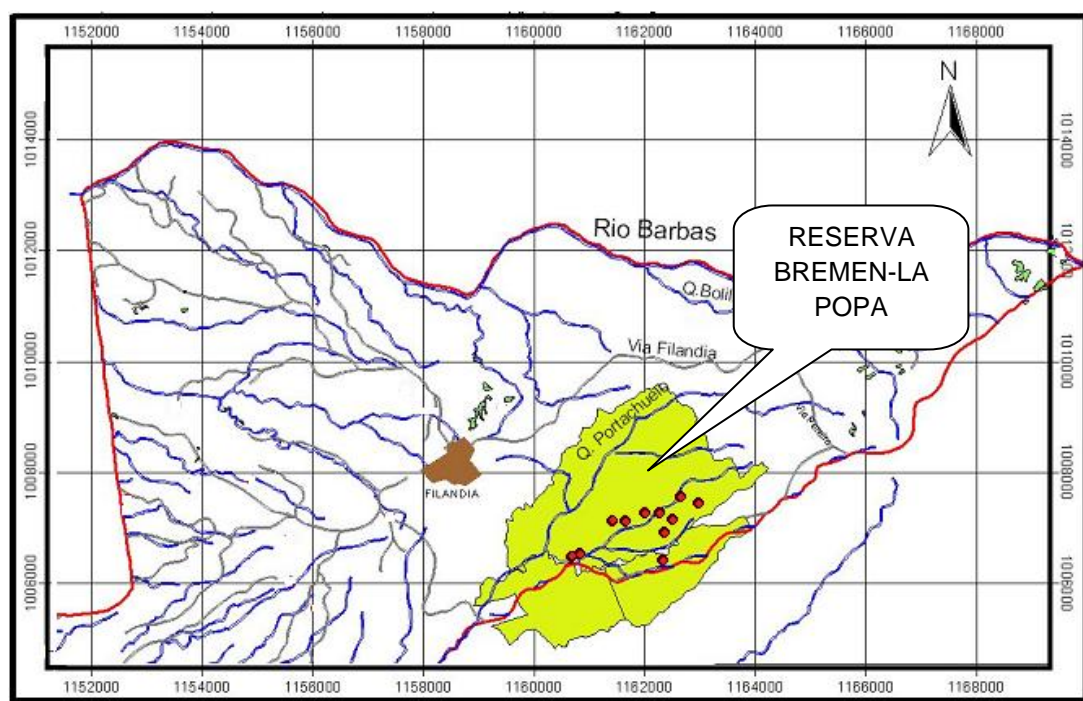


Figura 15. Sitios de recolección en la Reserva Natural Bremen-La Popa (Filandia-Quindío-Colombia)(Ventana 1 del CIEBREG).

Las veintiún (21) plantas recolectadas fueron clasificadas taxonómicamente, a cada una se le asignó un número de identificación interna (UTP) dado por el GB-PN y especímenes de las mismas fueron depositadas en el Herbario de la Universidad de Antioquía, donde se les asignó un número de registro (voucher), como se presentan en la tabla 5; Además, se muestran los pesos de los extractos de diclorometano y de metanol obtenidos para cada uno de ellos.

Tabla 5. Plantas recolectadas en Reserva Natural Bremen-La Popa.

FAMILIA	NOMBRE CIENTÍFICO	No. UTP	VOUCHER FJR	PESO EXTRACTO (g)	
				CH ₂ Cl ₂	MeOH
Apocynaceae	<i>Cynanchum sp.</i>	123	3964	6,362	32,286
Asclepiadaceae	<i>Oxypetalum cordifolium</i>	139	3981	12,797	16,331
Asteraceae	<i>Pentacalia urbanii</i>	122	3963	4,276	9,282
	<i>Tilesia baccata</i>	133	3974	7,107	9,282
	<i>Mikania banisteriae</i>	124	3965	4,972	8,270
	<i>Clibadium pentaneuron</i>	125	3966	5,757	22,907
	<i>Baccharis sp.</i>	131	3972	7,587	10,901
	<i>Lepidaploa lehmannii</i>	135	3976	7,600	10,328
	<i>Mikania lloensis</i>	136	3977	5,973	14,375
	<i>Critoniella acuminata</i>	127	3968	1,058	12,617
Euphorbiaceae	<i>Alchornea calophylla</i>	128	3969	5,469	22,178
	<i>Acalypha diversifolia</i>	126	3967	3,756	24,975
	<i>Hyeronima sp.</i>	130	3971	4,912	40,649
	<i>Alchornea grandis</i>	140	3982	3,159	14,058
Rubiaceae	<i>Guettarda crispiflora</i>	132	3973	4,823	25,891
	<i>Faramea sp.</i>	138	3979	4,818	9,601
Solanaceae	<i>Solanum acerifolium</i>	120	3961	9,720	11,695
	<i>Solanum sp.</i>	129	3970	6,359	36,344
	<i>Solanum lepidotum</i>	134	3975	3,626	13,043
	<i>Cestrum sp.</i>	137	3978	5,180	19,210
	<i>Solanum trachycyphum</i>	121	3962	5,657	7,389

6.6 CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA DE LOS EXTRACTOS DE LAS PLANTAS RECOLECTADAS

La marcha fitoquímica, permitió identificar los MS de los extractos de diclorometano y de metanol presentes en las plantas recolectadas en la RNB-LP y se presentan en la tabla 6.

Los núcleos más abundantes en los extractos de diclorometano fueron terpenos, triterpenos y esteroides (33.33%), seguidos por los flavonoides (28.57%), fenoles y taninos (19.05%), saponinas esteroidales y triterpénicas (14.29%), alcaloides (9.52%) y sesquiterpenlactonas (4.76%), los cuales se muestran en la figura 16.

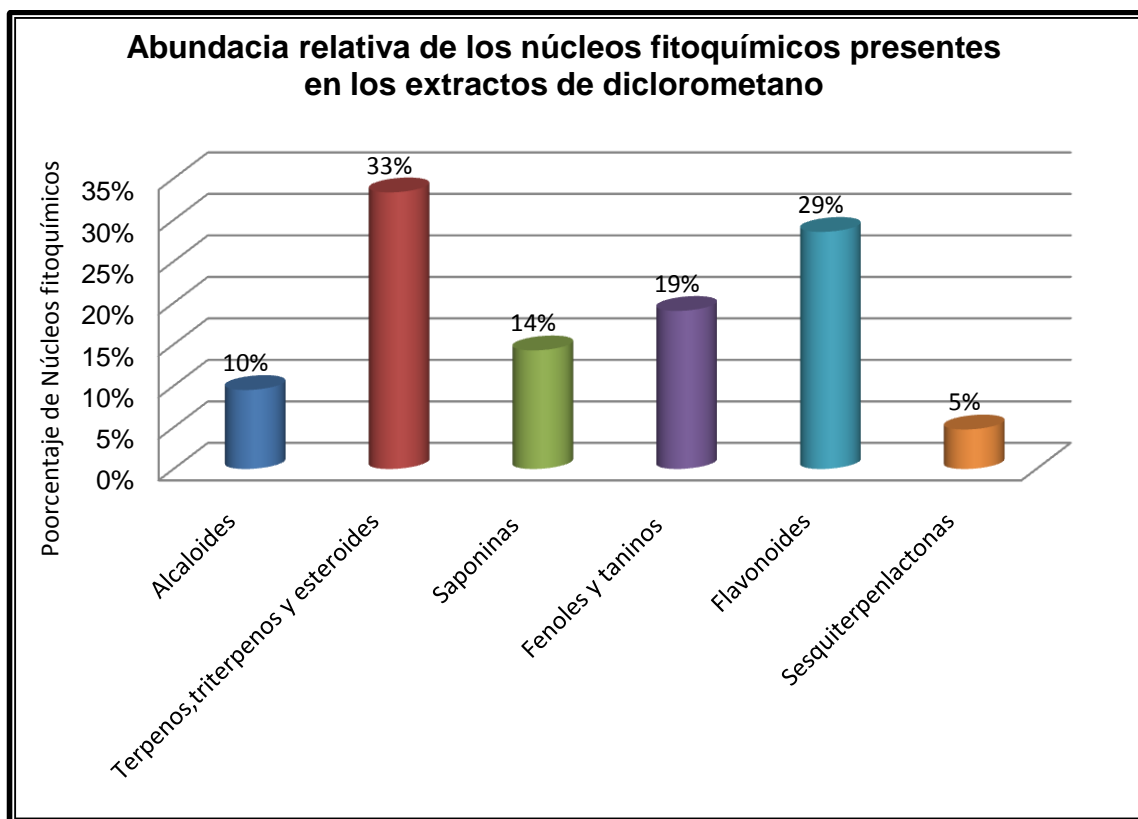


Figura 16. Núcleos fitoquímicos presentes en los extractos de diclorometano.

Tabla 6. Núcleos fitoquímicos detectados por TLC, presentes en las plantas evaluadas para el bioensayo de actividad alelopática.

PRUEBA									
Planta (UTP No.)	Dragendorff (Alcaloides)			Anisaldehído/CH ₃ COOH-H ₂ SO ₄ (Terpenos, triterpenos y esteroides)			Vainillina al 1 % en EtOH-H ₂ SO ₄ (Saponinas esteroidales y triterpénicas)		
	Ext. MeOH	Ext. CH ₂ Cl ₂	Ext. <i>n</i> -Hexano	Ext. MeOH	Ext. CH ₂ Cl ₂	Ext. <i>n</i> -Hexano	Ext. MeOH	Ext. CH ₂ Cl ₂	Ext. <i>n</i> -Hexano
120	+++	-	-	+++	-	-	++	-	-
121	+++	+	-	+++	-	-	+++	-	-
122	-	+	-	-	-	-	+	-	-
123	-	-	-	-	+	+	-	-	-
124	-	-	-	+	++	+++	+	-	+
125	-	-	-	++	-	-	++	-	-
126	-	-	-	-	+	-	-	-	-
127	+	-	-	+	-	+++	++	-	+
128	-	-	-	+++	-	-	+++	++	-
129	++	-	-	-	-	-	++	-	-
130	-	-	-	+++	+++	-	+++	-	-
131	-	-	-	-	-	+++	++	++	++
132	-	-	-	-	++	-	-	-	-
133	-	-	-	++	-	-	+	-	-
134	+++	-	-	-	-	-	-	-	-
135									
136	-	-	-	-	-	-	++	-	-
137	+	-	-	-	+	+	-	-	-
138	-	-	-	+	-	-	+	-	-
139	-	-	-	-	+++	+++	-	-	-
140	-	-	-	++	-	-	++	++	++

Continuación **tabla 6.**

PRUEBA									
Planta (UTP No.)	FeCl ₃ al 5 % en sol. Salina sat. (Fenoles y taninos)			AlCl ₃ al 2 % en EtOH absoluto (Flavonoides)			Ácido 3,5-dinitrobenzóico-MeOH-KOH (Sesquiterpenlactonas)		
	Ext. MeOH	Ext. CH ₂ Cl ₂	Ext. <i>n</i> -Hexano	Ext. MeOH	Ext. CH ₂ Cl ₂	Ext. <i>n</i> -Hexano	Ext. MeOH	Ext. CH ₂ Cl ₂	Ext. <i>n</i> -Hexano
120	-	+	-	-	+	-	-	-	-
121	-	-	-	-	-	+	-	-	-
122	++	+	-	+++	-	-	-	-	-
123	-	-	-	-	-	-	-	-	-
124	++	-	-	++	-	-	-	-	-
125	-	-	-	-	-	-	+	-	-
126	+++	-	-	-	-	-	++	-	-
127	-	-	-	-	-	-	-	-	-
128	+++	+	+	++	++	-	++	-	-
129	-	-	-	-	-	-	+	-	-
130	++	+	-	+	-	-	++	-	-
131	+	-	-	-	-	-	-	++	-
132	-	-	-	-	-	-	-	-	-
133	-	-	-	-	++	-	-	-	-
134	-	-	-	-	++	-	-	-	-
135									
136	-	-	-	-	-	-	-	-	-
137	-	-	-	-	-	-	-	-	-
138	-	-	-	-	+	-	-	-	-
139	-	-	-	++	-	-	+	-	-
140	+++	-	-	-	++	-	-	-	-

Presencia: +++: Abundante; ++: Moderada; +: Baja; -: Ausente.

Por otra parte, los extractos de metanol mostraron mayor presencia de saponinas esteroidales y triterpénicas (66.67%), seguidos por los terpenos, triterpenos y esteroides (47.62%), fenoles y taninos (33.33%), alcaloides (28.57%), sesquiterpenlactonas (33.33%) y flavonoides (23.81%); los porcentajes de los núcleos fitoquímicos presentes en dichos extractos se ilustran en la figura 17.

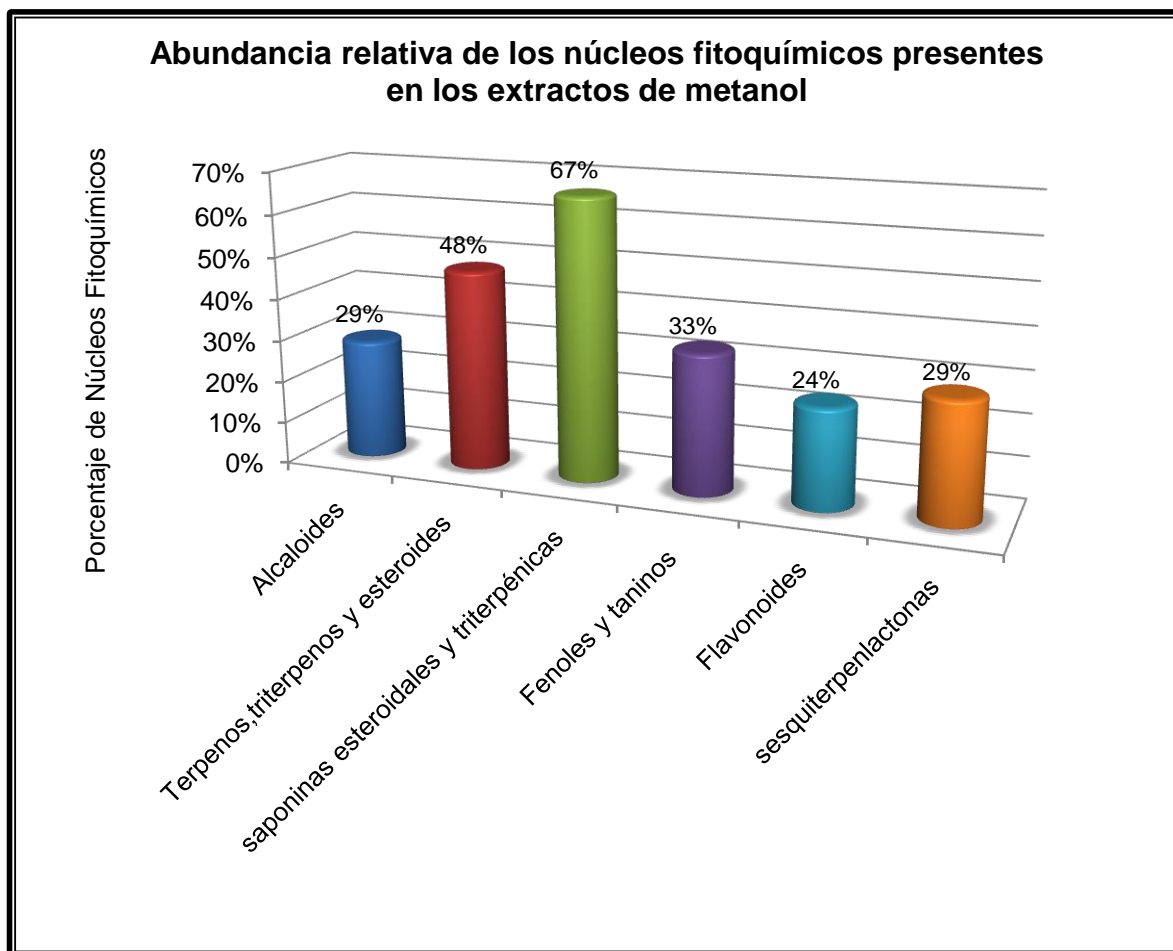


Figura 17. Núcleos fitoquímicos presentes en los extractos de metanol.

Como se puede deducir la presencia de MS detectados fue mayor en los extractos de metanol que en los de diclorometano, por lo que la probabilidad de

encontrar actividad alelopática en dichos extractos puede ser más alta en los metanólicos.

Los núcleos caracterizados en este trabajo, coinciden con los identificados por Ferguson y Rathinasabapathi, (2003) como causantes del efecto alelopático en extractos vegetales. Estos aleloquímicos fueron fenoles, flavonoides, terpenos, alcaloides y esteroides.

6.7 ACTIVIDAD ALELOPÁTICA *in vitro*

En este trabajo se evaluó la actividad alelopática *in vitro* de los extractos de diclorometano y metanol de las plantas recolectadas en la RNB-LP, a través del Porcentaje de Germinación Relativa (PGR) y Crecimiento Promedio de Radícula (CPR) de las semillas de *L. sativa*, con los cuales se calculó el Índice de Germinación (IG) (ver numeral 5.6).

En la figura 18 se ilustra la secuencia de las concentraciones a las cuales fueron evaluados los extractos de diclorometano y de metanol de las plantas recolectadas. De estos, el 43% (12 extractos de 21) presentaron actividad alelopática con efecto inhibidor sobre el crecimiento de las semillas de *L. sativa*; mientras que el 57% fueron inactivos (ver figura 14: criterios de selección).

Primero todos los extractos se evaluaron a las concentraciones de 2000, 1000 y 500 mg/L; a partir de éstas concentraciones, se seleccionaron como activos los extractos que presentaron un alto efecto inhibidor. Luego, se evaluaron a 125 mg/L, se analizaron, seleccionaron; posteriormente, aquellos que fueron activos en el rango de 2000-125 mg/L se examinaron a la concentración de 31.25 mg/L.

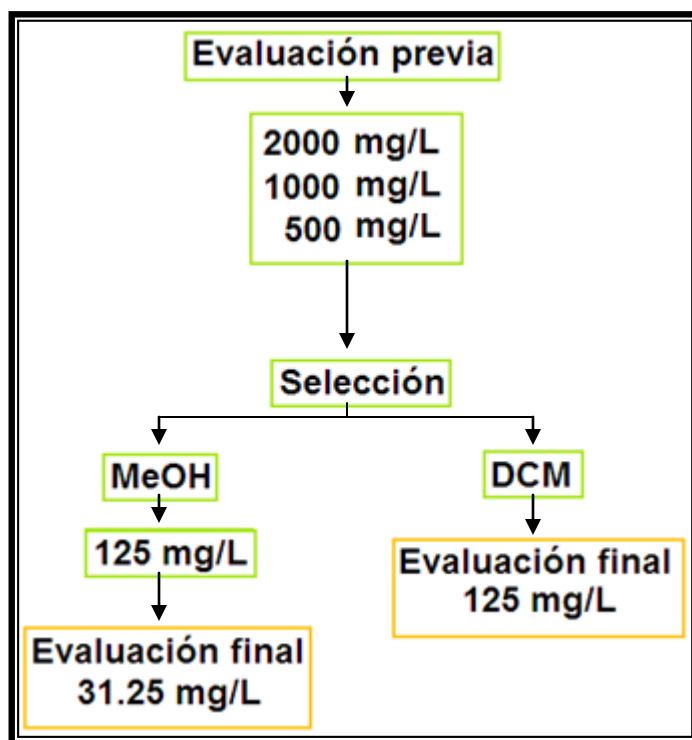


Figura 18. Secuencia de concentraciones de evaluación para extractos activos

La selección de los extractos activos se realizó mediante el cálculo del IG, el cual se espera que sean de cero. Como se mencionó en los numerales 5.6.2, 5.6.3 y 5.6.4 el IG proviene del producto de la fracción del PGR y del CPR. Se observó que no todas las semillas tienen la misma capacidad de degradar las sustancias externas, ni crecer, debido a la variabilidad genética. Por lo cual se pudo obtener para algunos extractos un PGR bajo (al germinar pocas semillas en cada UE) y con ello un IG bajo. Sin embargo, debido a esta capacidad de degradación de las semillas, se obtuvieron CPR variados. Lo anterior conduce a que en algunos casos no sea suficiente determinar el IG exclusivamente, sino que se debe analizar cada parámetro de medición por separado, para conocer cual de los dos aspectos (germinación o crecimiento) tiene efecto sobre la acción inhibitoria el extracto estudiado.

6.7.1 Actividad alelopática de los extractos de diclorometano

Los extractos de diclorometano fueron evaluados a las concentraciones de 2000, 1000, 500 y 125 mg/L como se mostró en la figura 18. Los resultados obtenidos de los Porcentajes de Germinación Relativos (PGR) y del Crecimiento Promedio de Radícula (CPR) se presentan en el anexo 1 y en los gráficos de los anexos 2 al 4, las cuales permitieron la obtención del IG para estos extractos.

A partir de los Índices de Germinación (IG) que se obtuvieron para todas las concentraciones evaluadas de los extractos estudiados (ver tabla 7) se seleccionaron los que inhibieron la germinación de *L. sativa* a 2000, 1000 y 500 mg/L en un 100% y lo hicieron igual al control positivo (CP) con valores de PGR y CPR iguales a cero. Además, se consideraron también aquellos extractos con valores de IG muy cercanos a cero.

Para los extractos de diclorometano, a concentraciones de 2000 y 1000 mg/L, el extracto de diclorometano que presentó actividad alelopática fue el de la especie *Critoniella acuminata* (UTP-127, Asteraceae), quien tuvo un IG de 0.0 a ambas concentraciones e inhibieron la germinación, mientras que a 500 mg/L el IG fue de 0.22, muy cercano a cero y al bajar más la concentración (125 mg/L) el IG fue de 3.19, como se observa en la tabla 7. En contraste, el resto de los extractos incrementaron el crecimiento de la radícula e hipocótilo a medida que se bajó la concentración de los mismos en el rango de concentraciones analizadas.

Tabla 7. Índice de germinación (IG) de los extractos de diclorometano.

No. UTP	Concentraciones (mg/L)			
	2000	1000	500	125
	IG			
120	3,71	21,86	16,46	NE
121	0,70	7,30	9,14	NE
122	0,23	4,18	12,85	NE
123	0,91	12,81	17,00	NE
124	1,15	10,77	16,11	NE
125	0,12	3,93	12,66	NE
126	2,43	11,35	14,75	NE
127	0,00	0,00	0,22	3,19
128	0,31	16,27	13,86	NE
129	0,30	9,21	10,64	NE
130	0,79	12,51	10,30	NE
131	1,14	4,03	13,73	NE
132	1,58	3,65	19,14	NE
133	0,54	2,47	11,27	NE
134	9,84	4,78	10,65	NE
135	0,90	17,12	15,65	NE
136	2,81	20,35	15,31	NE
CN	31,74	36,23	29,91	28,62
CP	0	0	0	0

NE: No evaluados, por no presentar efecto inhibitorio a 500 mg/L.

En la figura 19, se ilustra el Crecimiento Promedio de las Radículas de las semillas de *L. sativa* tratadas con el extracto de diclorometano activo *C. acuminata* (UTP-127) a 125 mg/L, presentó un CPR de 5.6 mm frente a un CPR para el control negativo (CN) de 29.5 mm; por lo cual, se presentó una disminución parcial en el crecimiento a esta concentración de estudio y un efecto fuerte sobre este. Por otro lado, se determinó que a 125 mg/L el número de semillas tratadas con este extracto lograron germinar en menor cantidad que el CN (ver figura 20), sin embargo, el extracto *C. acuminata* (UTP-127) proporcionó un efecto moderado sobre la germinación, porque más de la mitad del total de semillas iniciales lograron germinar (57%).

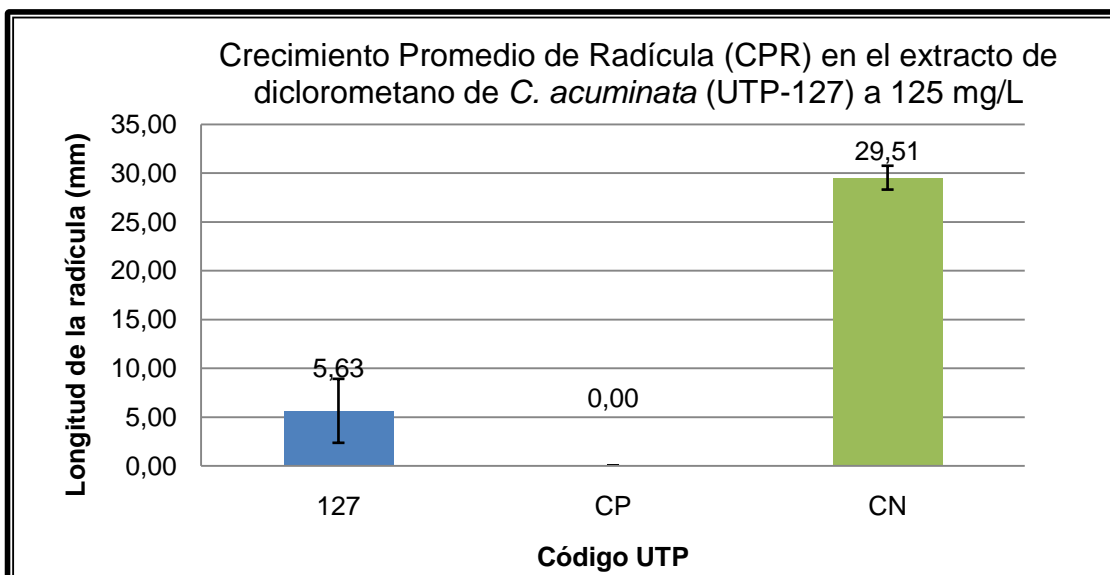


Figura 19. Crecimiento Promedio de Radícula (CPR) del extracto diclorometano de *C. acuminata* (UTP-127, Asteraceae) a 125 mg/L, frente al bioensayo de alelopatía con semillas de *L. sativa*.

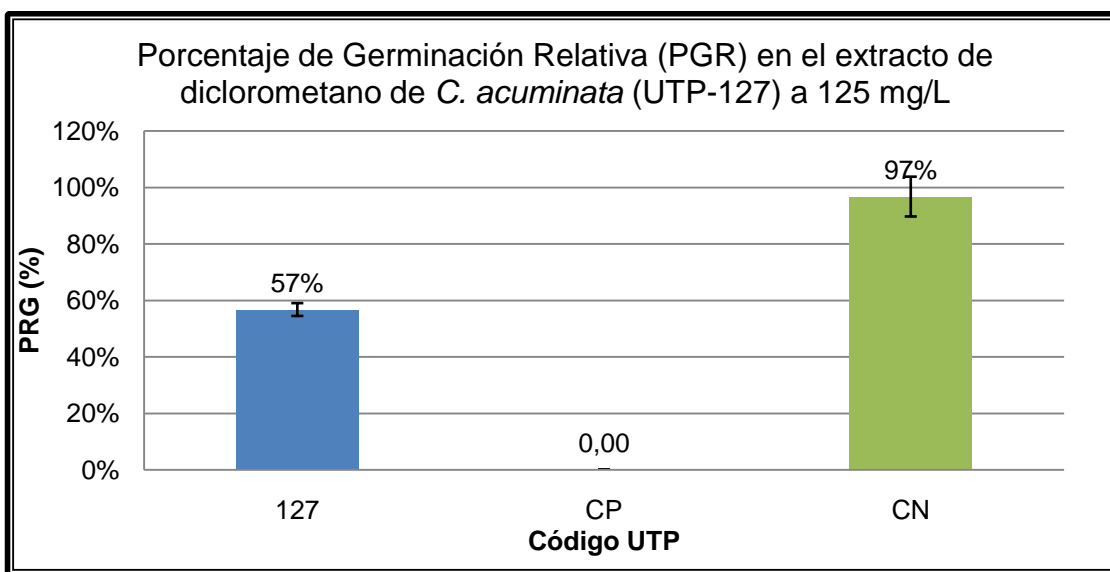


Figura 20. Porcentaje de Germinación Relativa (PGR) del extracto de diclorometano de *C. acuminata* (UTP-127) a 125 mg/L, frente al bioensayo de alelopatía con semillas de *L. sativa*.

La marcha fitoquímica realizada no permitió evidenciar fitocompuestos para el extracto de diclorometano de la especie *C. acuminata* (UTP-127); sin embargo, deben existir otros núcleos fitoquímicos que no fueron evaluados y que podrían ser los causantes del efecto alelopático inhibitor de esta especie sobre *L. sativa*.

La especie que inhibió fuertemente el crecimiento de las semillas fue *C. acuminata* (UTP-127); sin embargo, hasta la concentración de 500 mg/L los demás extractos estudiados también presentaron dicho efecto, pero en menor grado, lo anterior debido a que el IG fue inferior al del CN en el rango de concentraciones de 2000-500 mg/L. Además, sí se comparan los PGR y CPR máximos de los extractos (21.0 mm y 93%), con los PGR y CPR del CN (29.9 mm y 100%, ver anexo 4), se observa una inhibición en el desarrollo de las plántulas al haber tratado sus semillas con los extractos de diclorometano no activos. En el anexo 4 se observa dicho comportamiento.

6.7.2 Actividad alelopática de los extractos metanólicos

Los Índices de Germinación (IG) de los extractos metanólicos evaluados a las concentraciones de 2000, 1000, 500, 125 y 31.25 mg/L, fueron obtenidos a partir de los resultados respectivos de PGR y CPR presentados en el anexo 5.

Los extractos metanólicos que presentaron los mayores efectos inhibitorios sobre semillas de *L. sativa* a 2000, 1000 y 500 mg/L con un IG igual a cero fueron: *Solanum aerifolium* (UTP-120, Solanaceae), *Solanum sp.* (UTP-129, Solanaceae), *Mikania banisteriae* (UTP-124, Asteraceae), *Baccharis sp.* (UTP-131, Asteraceae), *Lepidaploa lehmannii* (UTP-135, Asteraceae), *Mikania lloensis* (UTP-136, Asteraceae), *Acalypha diversifolia* (UTP-126, Euphorbiaceae), *Hyeronima sp.* (UTP-130, Euphorbiaceae) y *Guettarda crispiflora* (UTP-132, Rubiaceae) y sus respectivos valores se presentan en la tabla 8.

Tabla 8. Índice de Germinación (IG) de los extractos metanólicos.

No. UTP	Concentraciones (mg/L)				
	2000	1000	500	125	31,25
	IG				
120	0,00	0,00	0,00	0,00	0,68
121	2,23	2,07	8,60	NE	NE
122	4,30	14,22	17,40	NE	NE
123	16,97	21,77	18,90	NE	NE
124	0,00	0,00	0,00	0,00	0,66
125	4,84	18,19	20,40	NE	NE
126	0,00	0,00	0,00	0,00	0,92
127	0,00	13,48	15,00	NE	NE
128	0,06	0,00	16,90	19,58	NE
129	0,00	0,00	0,00	0,00	0,08
130	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02
131	0,03	0,00	0,00	0,00	0,44
132	0,00	0,00	0,00	0,00	0,17
133	0,00	13,39	18,70	NE	NE
134	0,01	0,00	9,30	0,00	0,21
135	0,00	0,00	0,00	0,00	0,61
136	0,02	0,00	0,00	0,00	1,02
137	0,01	0,00	11,00	0,00	0,67
138	0,00	11,08	14,80	NE	NE
139	0,01	20,58	21,00	NE	NE
140	0,00	7,81	11,40	NE	NE
CN	9,89	23,91	17,10	17,02	12,74
CP	0	0	0	0	0

NE: No evaluados, por no presentar efecto inhibitorio a 500 mg/L

Los extractos que presentaron en el rango de 2000-500 mg/L actividad alelopática con efecto inhibidor fueron evaluados a 125 mg/L y los parámetros de medición resultantes (PGR y CPR) se observan en las figuras 21 y 22.

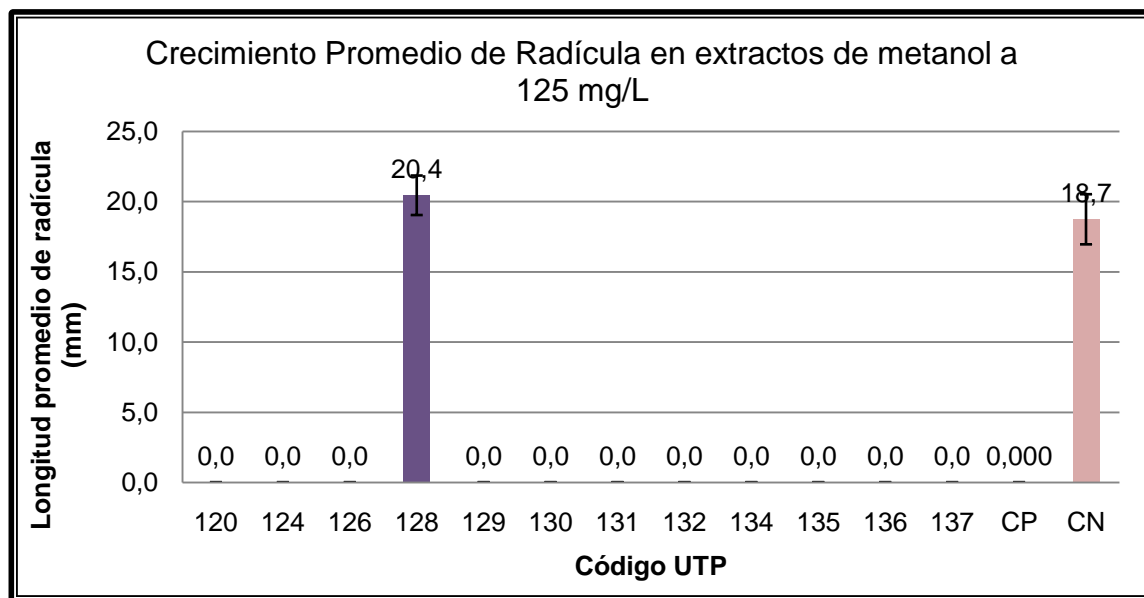


Figura 21. Crecimiento de radícula de los extractos metanólicos activos a 125 mg/L sobre semillas de *L. sativa*.

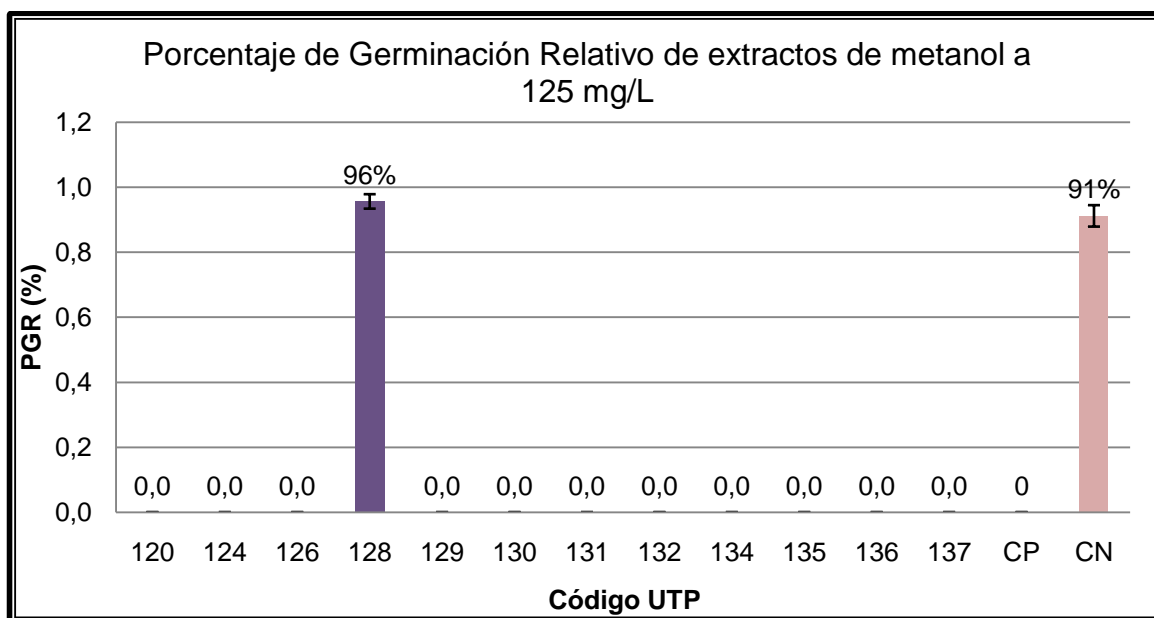


Figura 22. Porcentaje de germinación de los extractos metanólicos activos a 125 mg/L sobre semillas de *L. sativa*.

Aquellos extractos que tuvieron actividad alelopática con un fuerte efecto inhibidor a 125 mg/L, fueron evaluados a 31.25 mg/L. Todas las especies evaluadas a dicha concentración inhibieron fuertemente el crecimiento como se observa en la figura 23, destacándose *Solanum sp.* (UTP-129, Solanaceae) e *Hyeronima sp.* (UTP-130, Euphorbiaceae) por tener un CPR igual a 0,3 y 0,1 mm, respectivamente.

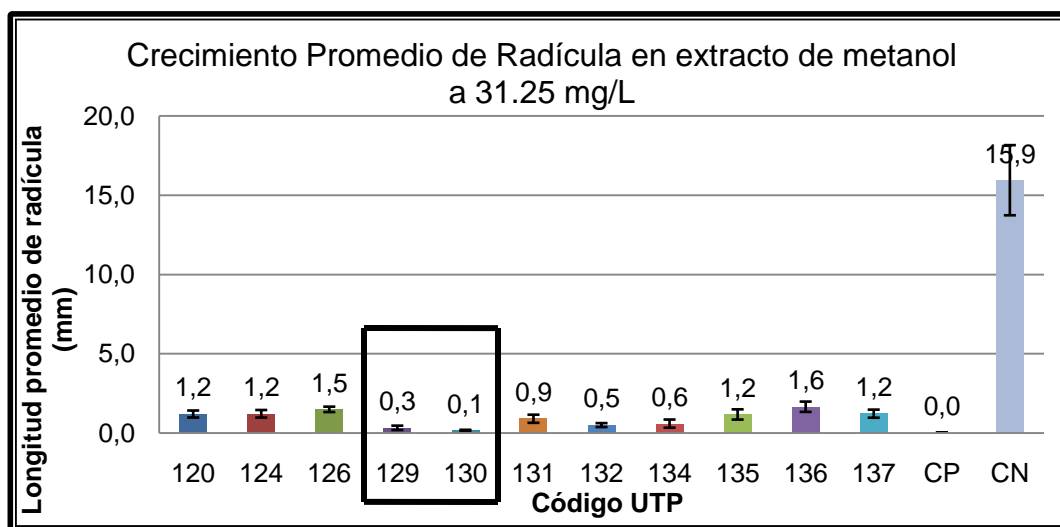


Figura 23. Crecimiento de radícula de los extractos metanólicos activos a 31,25 mg/L sobre semillas de *L. sativa*.

A su vez, *Solanum sp.* (UTP-129, Solanaceae) e *Hyeronima sp.* (UTP-130, Euphorbiaceae) presentaron un PGR de 25% y 11%, respectivamente, como se observa en la figura 24. Estos resultados junto con los anteriores, confirman el efecto potencial inhibitorio presentado por dichas especies en la germinación de *L. sativa*.

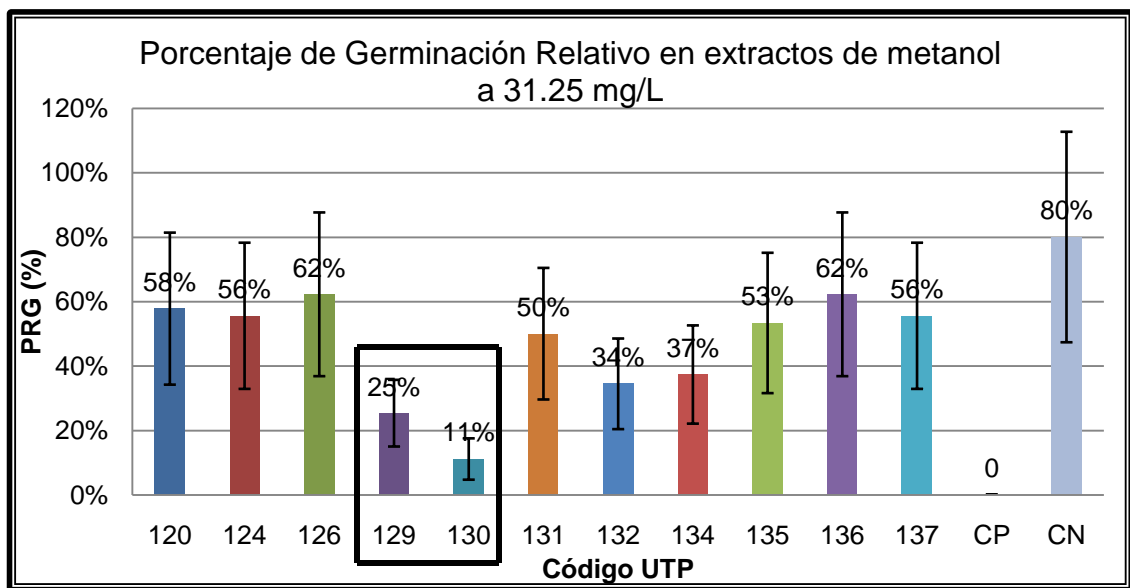


Figura 24. Porcentaje de germinación de los extractos metanólicos activos a 31,25 mg/L sobre semillas de *L. sativa*.

En la marcha fitoquímica realizada para estas dos especies, se identificó la presencia de saponinas esteroidales y triterpénicas, terpenos, triterpenos, esteroides, fenoles, taninos, sesquiterpenlactonas y flavonoides, los cuales podrían ser las responsables de la inhibición de la germinación de las semillas de *L. sativa*.

No obstante, Herrera, (2005) reportó que los extractos metanólicos de *Solanum sp.*, *Solanum lepidotum* y *Acalypha diversifolia*, no inhibieron la germinación ni alteraron la morfología de las radículas de *L. sativa*; en contraste con los datos obtenidos en el presente estudio.

De las figuras 21 y 22 se destacó a la especie *Alchornea calophylla* (UTP-128, Euphorbiaceae) por ser la única especie que presentó efecto estimulante al ser evaluado a 125 mg/L, donde el CPR y el PRG fueron superiores al CN, con valores de 20.4 mm y 96%, respectivamente, los cuales comparados con los del CN que fueron de 18.7 mm y 91%, confirma lo anterior.

Dentro de los fitocompuestos identificados para la especie *A. calophylla* (UTP-128) se detectó la presencia de saponinas esteroidales y triterpénicas; por lo cual se considera que dicho efecto posiblemente se debió a estos núcleos fitoquímicos. Esta especie presentó un efecto inhibidor en la germinación de las semillas de *L. sativa* a concentraciones superiores a 125 mg/L, pero según los criterios de selección a 500 mg/L se debió tener un IG igual a cero, y era el valor que se esperaba porque se inhibió totalmente la germinación a 2000 y 1000 mg/L, no siendo así, se seleccionó por presentar un potencial efecto inhibidor al igual que las especies *Solanum lepidotum* (UTP-134, Solanaceae) y *Cestrum sp.* (UTP-137, Solanaceae). Sin embargo, *A. calophylla* (UTP-128) fue la única que a una baja concentración (125 mg/L) tuvo un efecto estimulante sobre el crecimiento radicular y se descartó a dicha concentración por no cumplir con el objeto de este trabajo al no considerarse un agente herbicida.

Resultados parecidos los obtuvieron Waller et al., (1992) quienes comprobaron presencia de saponinas triterpénicas, al realizar el ensayo de actividad alelopática con extractos evaluados a 1, 10, 100 y 1000 mg/L; los extractos estudiados se caracterizaron por presentar efecto inhibidor sobre semillas de *L. sativa* a concentraciones superiores a 100 mg/L, y a su vez, por estimular la germinación y el crecimiento a concentraciones entre 10 y 100 mg/L debido a la acción de las saponinas triterpénicas.

Retomando los resultados obtenidos a 500 mg/L, se puede observar en el anexo 8 que 17 extractos de 21 evaluados, presentaron un CPR inferior al CN y 10 de los extractos tuvo un PRG por debajo del CN; lo anterior, indica que un alto porcentaje de extractos evaluados tuvo un efecto inhibidor, aunque no todos fueron activos al bajar las concentraciones, como se expuso anteriormente.

Como se presenta en la tabla 8, los extractos inactivos que tuvieron un ligero efecto positivo fueron *Cynanchum sp.* (UTP-123, Apocynaceae), *Pentacalia urbanii* (UTP-122, Asteraceae), *Clibadium pentaneuron* (UTP-125, Asteraceae),

Tilesia baccata (UTP-133, Asteraceae) y *Oxypetalum cordifolium* (UTP-139, Asclepiadaceae) a 500 mg/L.

Otro efecto alelopático que se detectó durante el experimento, fue la oxidación de las raicillas de *L. sativa* al ser tratadas con el extracto de la especie *Solanum trachycyphum* (UTP-121, Solanaceae), el cual inhibió el desarrollo de las mismas. Lo cual se reflejó en el IG presentado por *S. trachycyphum* (UTP-121) y al compararlo con el IG del control negativo (CN). Resultados semejantes fueron obtenidos por Turk y Tamaha, (2003).

Vitto et al., (1997) y Herrera, (2005), resaltaron en sus estudios la fuerte presencia de aleloquímicos en las especies pertenecientes a la familia Solanaceae y es de anotar que en los resultados expuestos anteriormente, que la mayor presencia de aleloquímicos se encuentra en esta familia al mostrar que el 19.05% (4 de 21 extractos activos) pertenecen a la Solanaceae, el 14.30% (3 de 21 extractos activos), hacen parte de la familia Euphorbiaceae, el 4.76% (1 de 21 extractos activos) están asociadas a la familia Rubiaceae y el restante 19.05% pertenecieron a la familia Asteraceae (ver figura 25).

Las familias Solanaceae y Asteraceae fueron las más representativas en este trabajo por contener especies con aleloquímicos y destacarse por su acción inhibitoria en la germinación de los semillas de *L. sativa*. Por ejemplo, la especie *Solanum lycocarpum* A. St.-Hil. (Solanaceae), presentó efecto inhibitor sobre la germinación, el crecimiento y cambios en la morfología radicular de *Sesamum indicum* L. (Pedaliaceae) (Sarah et al., 2004).

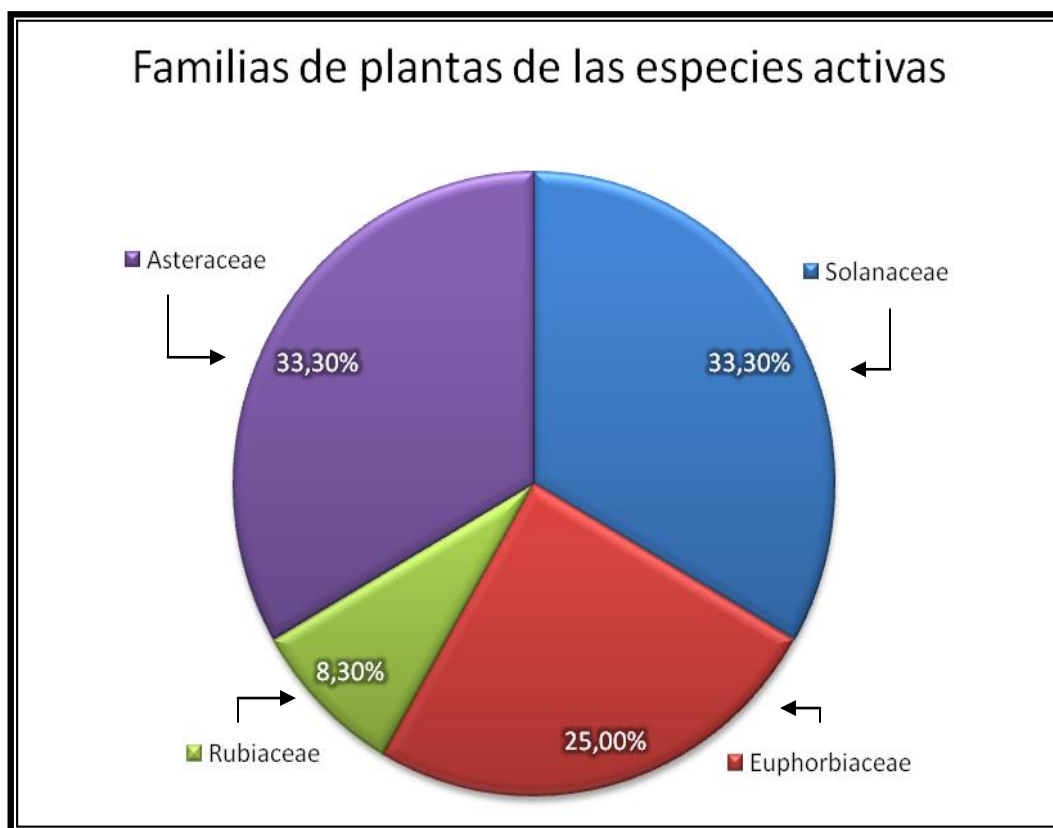


Figura 25. Porcentaje de las familias que presentaron actividad alelopática evaluadas en este trabajo.

También el estudio realizado por Fukuhara et al., (2004) mostró como fracciones de la especie *Solanum arundo* (Solanaceae) inhibieron la germinación de *L. sativa*; Duke et al., (1999) encontraron que el género *Solanum* posee especies con efecto alelopáticos, debido a la presencia de compuestos fenólicos.

Romero et al., (2005) encontraron mediante un bioensayo de actividad alelopática que la especie *Lycopersicon esculentum* (Solanaceae), presentó 75% de inhibición en el crecimiento de la radícula de la especie *Sicyos deppei*.

Los estudios anteriores demuestran que en la familia Solanaceae, existen varios géneros con actividad alelopática reforzando los resultados alcanzados en este trabajo.

Otra familia que también se destacó por presentar especies con altos resultados inhibitorios en la germinación y el crecimiento, fue la Asteraceae, que según Achnine et al., (1999) posee varias especies que se caracterizan por tener un alto potencial alelopático. Por ejemplo *Pluchea lanceolata* (Asteraceae) es una fuente de agentes aleloquímicos con efecto inhibidor del crecimiento de las semillas (Inderjit, 1998).

Xuan et al., (2005) reportaron efecto alelopático en varios extractos de especies de la familia Asteraceae, lo cual corrobora los resultados alcanzados con este trabajo.

7 CONCLUSIONES

Las plantas recolectadas en la RNB-LP presentaron un efecto inhibitor en la germinación y el crecimiento de semillas de *Lactuca sativa* a las diferentes concentraciones ensayadas.

Para los extractos de diclorometano la actividad inhibitoria fuerte fue por la especie *Critoniella acuminata* (UTP-127, Asteraceae), la cuál fue evaluada a 2000, 1000, 500 y 125 mg/L.

Los extractos metanólicos que presentaron un efecto alelopático potente, en el rango de concentraciones evaluadas (2000-31.25 mg/L) fueron: *Mikania banisteriae*, *Baccharis* sp., *Lepidaploa lehmannii*, *Mikania lloensis*, *Acalypha diversifolia*, *Hyeronima* sp., *Guettarda crispiflora*, *Solanum acerifolium*, *Solanum* sp., *Solanum lepidotum*, y *Cestrum* sp.

Entre los extractos de metanol, las especies más activas fueron *Solanum* sp. (UTP-129, Solanaceae) e *Hyeronima* sp. (UTP-130, Euphorbiaceae).

Las familias que presentaron mayor inhibición de las semillas de *L. sativa* fueron la Asteraceae y Solanaceae, por presentar mayor número de especies con efecto alelopático según el bioensayo de actividad alelopática *in vitro*.

8 RECOMENDACIONES

Emplear técnicas de separación cromatográfica a las especies más activas, entre las que se destacan *Solanum sp.* (UTP-129, Solanaceae) e *Hyeronima sp.* (UTP-130, Euphorbiaceae), para la obtención de los metabolitos secundarios responsables de dicho efecto.

También emplear el bioensayo de actividad alelopática desarrollado en este trabajo, para bioguiar las fracciones de extracto durante los procesos de separación destinados a la obtención de un herbicida sintético, desarrollado con la finalidad de disminuir el impacto ambiental y el aumento en la dosificación requerida por el cultivo. Además, se recomiendan las especies activas en este trabajo para su obtención.

Desarrollar como lo sugieren Turk y Tawaha, (2003) y Restrepo y Galván, (2006) trabajos en campo para la estandarización de biopreparados que puedan ser empleados como agentes aleloquímicos

Se sugiere realizar la pregerminación de las semillas estudiadas en el ensayo de actividad alelopática, en investigaciones orientadas a la obtención de datos cuantitativos cuando se quiera controlar el crecimiento frente a un extracto de planta.

BIBLIOGRAFÍA

- [1]. Achnine L., Bah M., Pereda-Miranda R., Mata R. y Lotina-Hennsen B. Tricolorin A, A Potent Natural Non-photophosphorylation Uncoupler and Inhibitor of the Q_b Redox Enzyme on Spinach Chloroplasts. Recent Advances of Allelopathy; 1999. 1: 205-207.
- [2]. Aportela Gilling P., Gonzáles Pérez Y. Evaluación toxicológica del Dicromato de Potasio en plantas de lechuga, *Lactuca sativa* L. Anuario Toxicológico. Cuba; 2001. 1: 98-103.
- [3]. Artavia G., Eckhardt K. y Araujo J. Efecto de la luz sobre la densidad y morfología de las plantas en un claro dominado por *duroia hirsuta*, estación biológica madre selva: río osora, iquitos, Perú. Revista Reflexiones; 2004. 83: 131-135.
- [4]. Bertín M., Torres Joaquín, Hernández Alfonso G., Pérez Jorge P., Herrera José H., García Gabino, Trejo Carlos L. Efecto del Nitrógeno y fecha de cosecha sobre el rendimiento y calidad de semilla de pasto guinea. Montecillo. Edo de México; 2001. 245-254.
- [5]. Bradford, K.J. Water relations in seed germination; Seed Development and Germination; 1995. 1 (13): 351-396.
- [6]. Buznego M.T., Cuba A., Garriga E., Cuéllar A. y Pérez H. Efecto de los extractos acuoso y etanólico de *Cestrum nocturnum* L. sobre la conducta exploratoria y pruebas de analgesia. Revista Cubana de Plantas Medicinales; 2005. 10: 1-10.
- [7]. Chicy, T.A.; Kielbaso, J. J. Allelopathy as an inhibition factor in ornamental tree growth: Implications from literature. J. Arboric; 1998. 24: 274-279.
- [8]. Chon Sang-UK, Jang Hong-Gi, Kim Dong-Kwan, Kim Young-Min, Boo Hce-Ock, Kim Young-Jin. Allelopathic potencial en lettuce (*Lactuca sativa*) plants. Scientia Horticulturae; 2005. 106: 309-317.
- [9]. Cuenca P., Ramírez V. Aberraciones cromosómicas en trabajadoras expuestas a plaguicidas. Rev. Biol. Trop; 2004. 52: 623-628.

- [10]. Curtis Helena, Barnes Sue, Mir Margalef, Shirley Baty y Margalef Ramón. Invitación a la biología. 5ª edición. Editorial Médica Panamericana; 1995. 862p.
- [11]. D'Abrosca B., Della Greca M., Fiorentino A., Monaco P., Previtera L., Simonet A., Zarrelli A. Potencial allelochemicals from *Sambucus nigra*. *Phytochemistry*; 2001. 58: 1073-1081.
- [12]. Duke S., Duke M.V., Paul R.N., Ferreira J.F.S., Vaughn K.C., Canel C., Tellez M.R., Rimando A.M. y Smeda R.J. Tissue Localization and Potential uses of Phytochemicals with Biological Activity. *Recent Advances in Allelopathy*; 1999. 1: 211-217.
- [13]. Ferguson J. J., Rathinasabapathi B. Allelopathy: How Plants Suppress Other Plants. Horticulture Science Department Florida. Serie HS944: 1-3.
- [14]. Fukuhara K., Shimizu K., Kubo I. Arudonine, an allelopathic steroidal glycoalkaloids from the root bark of *Solanum arundo* Mattei. *Phytochemistry*; 2004. 65: 1283-1286.
- [15]. Pinilla G.C. y Cardona G.J. Manejo integrado de arvenses en plantaciones de banano [Musa AAA]. Acorbat; 2002. 222-236.
- [16]. Gajardo Omar, Bazic Carlos, Avilés Lucrecia, Cañón Silvia y Dall Armando. Alelopatía del yuyo moro (*Acroptilon repens* L.) sobre maíz dulce. *Revista Pilquen- Sección agronomía*; 2004. 6: 1-6.
- [17]. García Patricio F., Gullas Javier, Martínez Jesús, Marzo Antoni, Melero Juan, Traveset Anna, Veintimilla Pilar, Verdú Miguel, Cerdán Vicent, Gasque María, Medrano Hipólito. Bases ecológicas para la recolección, almacenamiento y germinación de semillas de especies de uso forestal de la Comunidad Valenciana. Valencia; Gráficas Cervelló, SL; 2001. 82p.
- [18]. García H. Flora medicinal de Colombia. Segunda edición. Editorial Tercer Mundo. Bogotá. Tomo II – III; 1992.
- [19]. Gonçalves Soares, Reis Vieira. Inhibitions of germination and radical growth of lettuce (CV. Grand Rapids) by aqueous extracts of five species of *Glechisiaceae*. *Floresta e ambiente*; 2000. 7: 180-197.
- [20]. Herrera Patricia. Evaluación de actividad alelopática en extractos vegetales de zonas de reservas de la ecorregión cafetera colombiana. Pereira: Universidad Tecnológica de Pereira, Escuela de Tecnología Química; 2005. 61p.

- [21]. Hultberg Malin; Cysteine turnover in human cell lines is influenced by glyphosate. *Environmental Toxicology and Pharmacology*; 2007. 24: 19-22.
- [22]. Idrovo Alvaro. Plaguicidas usados en la Fumigación de Cultivos Ilícitos y Salud Humana: ¿una Cuestión de Ciencia o Política?. *Rev. salud pública*; 2004. 6: 199-211.
- [23]. Inderjit. Influence of *Pluchea lanceolata* (Asteraceae) on selected soil properties. *American Journal of Botany*; 1998. 85: 64-69.
- [24]. Jean-Yves A., Jacques F., Turati R., Epos S., Viamonte M. Para comprender las plantas y la diversidad del mundo vegetal. Bogotá: Panamericana editorial, 2006. 128p.
- [25]. Jiménez Gonzales Francisco. Actividad Alelopática y Antibacterial del extracto isopropanol - agua de *Menriettella trachyphylla* (Melastomataceae). Pereira: Universidad Tecnológica de Pereira, Escuela de Tecnología Química; 2002. 73p.
- [26]. Jorrín J., Prats E. Alleochemicals, Phytoalexins and Insect-Feeding Deterrents: Different Definitions for 7-hydroxylated Coumarins. *Recent Advance in Allelopathy*; 1999. 1: 179-189.
- [27]. Kato-Noguchi Hisashi, Macías Francisco A. Effects of 6-methoxy-2-benzoxalnone on the germination and α -amylase activity in lettuce seeds. *Jornal of plants physiology*; 2005. 162: 1304-1307.
- [28]. Kato-Noguchi Hisashi, Tanaka Yukiitishi. Allelopathic potencial of *Citrus junos* fruit waste from food processing industry. *Bioresource technology*. Japón; 2004. 94: 211-214.
- [29]. Kato-Noguchi Hisashi, Tanaka Yukiitishi, Murakami Toshiumi, Yamamura Shosuke, Fujihara Shinsuke. Isolation and identification os an allelopathic substance from peel of *Citrus junos*. *Phytochemistry*; 2002a. 61: 849- 853.
- [30]. Kato-Noguchi Hisashi. Isolation and identification o fan allelopathic substance in *Pisum sativum*, *Phytochemistry*; 2002b. 62: 1141-1144.
- [31]. Krautmann M., Turbay S. y Riscala E. Efectos alelopáticos de *Tridax procumbens* L; 2001: 1-9.
- [32]. Lloyla K., Estrada A. Áreas importantes para la conservación de las aves en los Andes Tropicales. Sitios prioritarios para la conservación de la biodiversidad. *BirdLife conservación*; 2005. 1: 185-186.

- [33]. Lu  zzet Kadio , Yanar Yusuf. Allelopathic effects of Plants Extracts Against Seed Germination of Some Weeds. Asian Journal of Plant Sciences; 2004. 4: 472-475.
- [34]. Macías F. A., Molinillo J. M. G., Galindo J. C., Varela R. M., Torres A., Simonet A. M. Terpenoids with potencial use as natural herbicide templates. Biologically Active Natural Products: Agrochemical; 1999. 1: 15-31.
- [35]. Macías Francisco A., Castellano Diego, Molinillo José M. G. Search for a Standard phytotoxic bioassay for allelochemicals. Selection of standard target species. J. Agric. Food Chem; 2000. 48: 2512-2521.
- [36]. Maldonado A. Daños genéticos en la frontera de ecuador por las fumigaciones del plan Colombia. Ecuador; 2003. 1-19.
- [37]. Maldonado A. Impactos en Ecuador de las fumigaciones realizadas en el Putumayo dentro del Plan Colombia. Ecuador; 2002. 1-19.
- [38]. Márquez M. E. F., López J. B. O. Detección del daño genotóxico agudo y crónico en una población de laboratoristas ocupacionalmente expuestos, IATREIA; 2003. 16: 275-282.
- [39]. Mendoza H. Ramírez P. Plantas con flórez de La Planada : guía ilustrada de familias y géneros. Santafé de Bogotá: Instituto Alexander von Humboldt; 2000. 244p.
- [40]. Moreno M  Teresa A., Ben to Luis M., Herrero Nieves S., Domínguez Susana L., Peñuelas Juan R. Estudio de nuevos métodos de determinación de la viabilidad de las semillas forestales: test de electroconductividad e índigo carmín. Comparación con el test del tetrazolio y su aplicación a *Pinus pinaster* y *Pinus halepensis*. En: Actas del III Congreso Forestal; 2001; Granada, Español. 653-658.
- [41]. Murillo E., Viña A., Pérez C., Ruiz V. Actividad Alelopática de las Arvenses Asociadas al Cultivo de Arroz (*Oryza sativa* L.) en el Tolima-Colombia. Información Tecnológica; 2006. 17 (2): 15-24.
- [42]. Naumov G. F. The significance of Allelopathic Factors in the Formation of Agrophytocenosis with high levels of Biological Nitrogen. Recent Advances in Allelopathy, A Science for the Future; 1997. 1: 109.
- [43]. Niño Jaime O., Bustamante Angélica M., Correa Yaned M., Mosquera Oscar M. Evaluación de extractos vegetales para el control de la Broca del café (*Hypothenemus hampei*, FERRARI). Scientia et technica; 2007. 13: 383-385.

- [44]. Nivia E. Cosmo Flux 411F X coadyudante adicionado al Roundup Ultra en la erradicación de Cultivos, Indepaz. Palmira; 2006. 1-4.
- [45]. Nivia E. Mujeres y Plaguicidas, una mirada a la situación actual, tendencias y riesgos de los plaguicidas. Primera edición. Palmira; 2000. 113p.
- [46]. Olaya L. E. Efecto alelopático sobre *Lactuca sativa* L. y Nemátida frente a *Meloidogyne* sp, de las Fracciones Orgánicas de *Calotropis procera* Air R. Br. Universidad del Tolima. Ibagué; 2005. 8-22.
- [47]. Ping-tao Li, Leeuwenberg Antony J., Middleton David J. Apocynaceae. Flora of China; 1995. 16: 143.188.
- [48]. Puentea M., Torres S., García H. Efectos alelopáticos del Girasol (*Helianthus annuus*) sobre malezas y cultivos de interés económico, otra alternativa para el desarrollo de una agricultura sustentable; 1999. 1-8.
- [49]. Restrepo Juan A. y Galván José U. Actividad Alelopática de algunas especies de los géneros Miconia, Tibouchina Henriettella, Tococa, Aciotis y Bellucia (Melastomataceae). Pereira: Universidad Tecnológica de Pereira, Escuela de Tecnología Química; 2006. 173p.
- [50]. Richard S. Differential Effects of Glyphosate and Roundup on Human Placental Cells and Aromatase. Environmental Health Perspectives; 2005. 113: 716-720.
- [51]. Ridenour W. M., Callaway R. M. The relative importance of allelopathy in interference: the effects of an invasive weed on a native bunchgrass. Oecologia. Missoula; 2001. 126: 444-450.
- [52]. Rodríguez H. G., Mederos D. M., Echeverría I. S. Efectos alelopáticos de restos de diferentes especies de plantas medicinales sobre el albahaca (*Ocimum basilicum* L.) en condiciones de laboratorio. Rev. Cubana Plant Med; 2002. 7: 67-72.
- [53]. Romero T., Sánchez S., SanJuan A., Anaya A.L. y Cruz R. Comparative effects of allelochemical and water stress in roots of *Lycopersicon esculentum* Mill. (Solanaceae). Plant Science; 2005. 168: 1059-1066.
- [54]. Ros Orta Serafín. La empresa de jardinería y paisajismo: Mantenimiento y conservación de espacios verdes. Publicado por Mundi-Prensa Libros, 2006; 544p.

- [55]. Sánchez José, Ettiene Gretty y Rivas Zulay. Determinación de glifosato en muestras de agua en la Cuenca del Río Catatumbo. Ciencia; 2005. 13: 211-217.
- [56]. Sarah C., Oliveira C., Gui A. y Borghetti F. Efeito alelopático de folhas de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hil. (Solanaceae) na germinação e crescimento de *Sesamum indicum* L. (Pedaliaceae) sob diferentes temperaturas. Acta Bot. Bras; 2004. 18: 401-406.
- [57]. Stahl E. Thin-layer chromatography. 15^a impression de la 2^a edición. Toppa printing Co. Singapore; 1969. 1014p.
- [58]. Tan P.V., Penlap V.B., Nyasse B. y Nguemo J.D. Anti-ulcer actions of the bark metanol extract of *Voacanga africana* in different experiment ulcer model in rats. Elsevier; 2000. 3: 423-428.
- [59]. Turk M. A., Tawaha A. M.; Allelopathic effects of Black mustard (*Brassica nigra* L.) on germination and growth of wild oat (*Avena fatua* L.). Crop Protection. Jordan; 2003. 22: 673-677.
- [60]. Varnero M. T. M., Rojas C. A., Orellana R. R. Índices de Fitotoxicidad en Residuos Orgánicos durante el compostaje, J. Soil Sc Nutr; 2007. 1: 28-37.
- [61]. Varnero, M. T., Orellana, R., Rojas, C., Santibañes, C. Evaluación de especies sensibles a metabolitos fitotóxicos mediante bioensayos de germinación. El Medioambiente en Iberoamérica: Visión desde la Física y la Química en los albores del Siglo XXI. Badajoz, España: Editor Juan F. Gallardo Lancho. Sociedad Iberoamericana de Física y Química Ambiental; 2006. Tomo III, 363-369.
- [62]. Velázquez B.M., Osca J.M., Jordá C., Marzal A. Estudio de la viabilidad de la eliminación de semillas de malas hierbas en el suelo por radiación de microondas. Bol. San. Veg. Plagas; 2003. 29: 53-62.
- [63]. Vitto L.A., Petenatti E.M. y Petenatti M.E. Recursos Herbolarios de San Luis (República Argentina) primera parte: Plantas Nativas; 1997. 49-66.
- [64]. Waller G., Yang C.F., Chen L.F., Su C.H., Liou R.M., Wu S.C., Young C.C., Lee M.R., Lee J.S., Chou C.H. y Kim D. Mungbean Saponins as Allelochemicals. Recent Advances in Allelopathy: A Science For The Future; 1992. 1: 91-108.
- [65]. Wieslaw O. Allelopathic significance of plant saponins. Recent Advance in Allelopathy, Science for de Future; 2001. 1: 167-178.
- [66]. Xuan T.D., Shinkichi T., Khanh T.D., Min C.I. Biological control of weeds and plant pathogens in paddy rice by exploiting plant allelopathy: an overview. Crop Protection; 2005. 24: 197-206.

- [67]. Yang Chi-Ming, Lee Chyoung-Ni, Chou Chang-Hung. Effects of three allelopathic phenolics on chlorophyll accumulation of rice (*Oryza sativa*) seedlings: I. Inhibition of supply-orientation. Bot. Bull. Acad. Sin; 2002. 43: 99-304.
- [68]. Yokotani Tomita K., Yoshiharu Fujii, Hashimoto Hirofumi, Yamashita Masamichi. Reduced allelopathic inhibition of lettuce (*Lactuca sativa*) growth caused by velvet bean (*Mucuna pruriens*) under 3D-clinorotation. Biological Sciences in Space; 2003. 17: 14-17.
- [69]. Yue-Sheng Y., Yuzo F. Inhibitory effects of volatile compounds released from rice callus on soybean callus growth: allelopathic evidence observed using in vitro cultures. Plant Science; 1991. 77: 103-110.
- [70]. Zalacain M., Sierrasesúmaga L., Patiño A. El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos. An. Sist. Sanit. Navar; 2005. 28: 227-236.

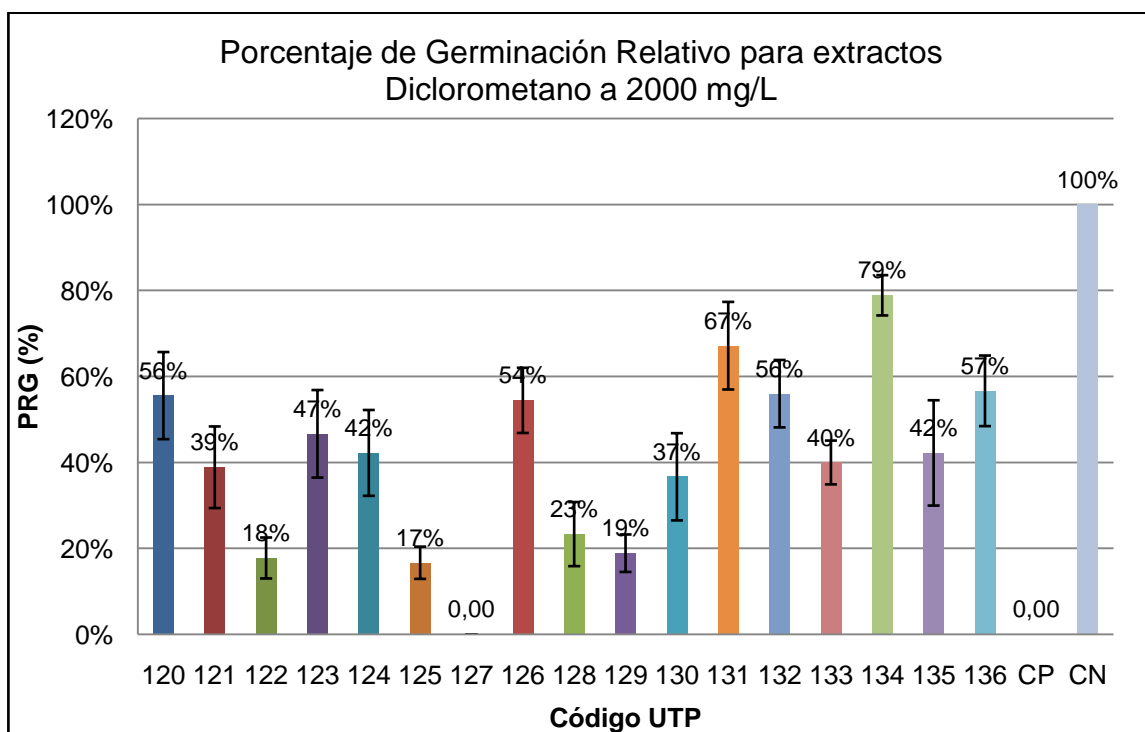
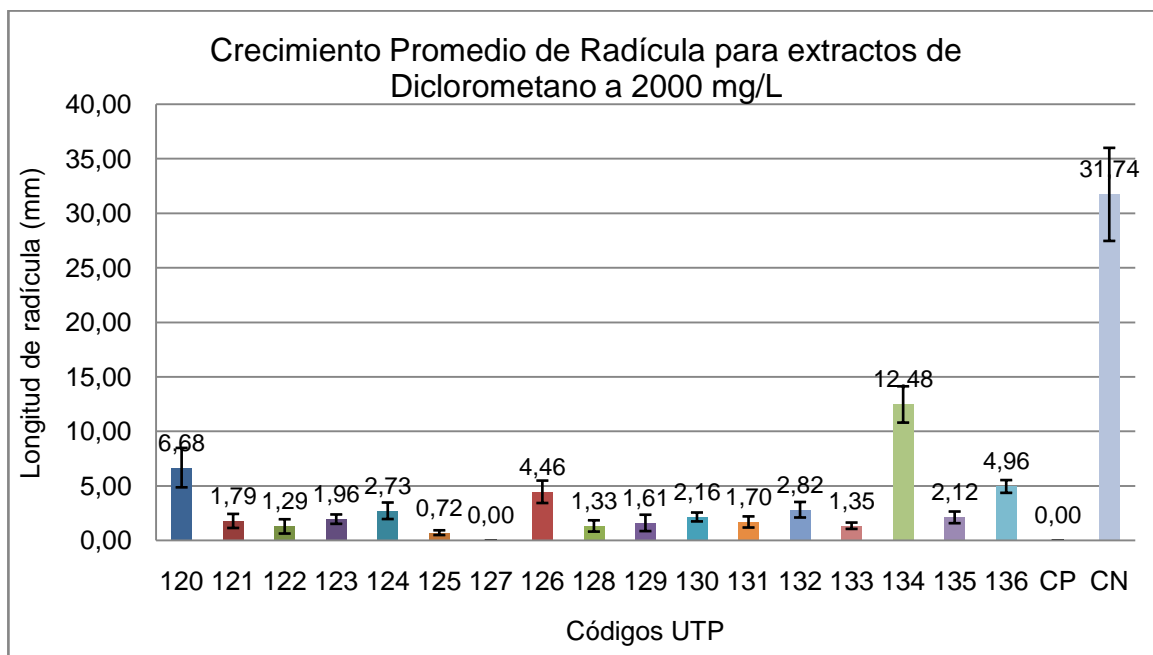
ANEXOS

ANEXO 1. Crecimiento Promedio de Radícula (CPR) y Porcentaje de Germinación Relativo (PGR) para extractos diclorometano.

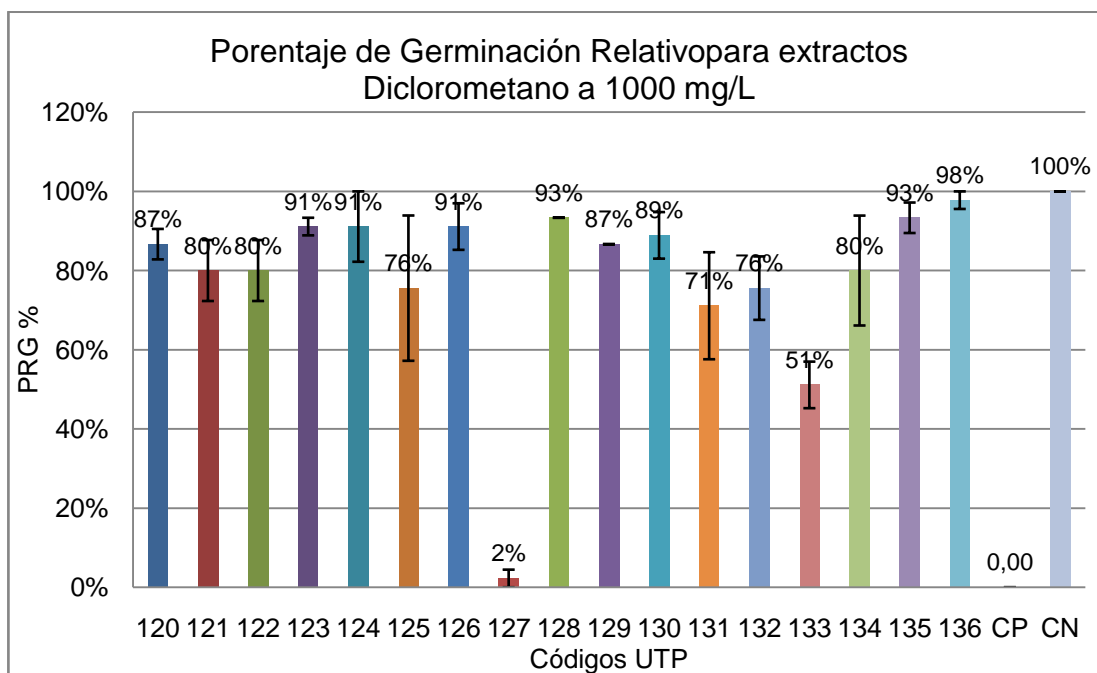
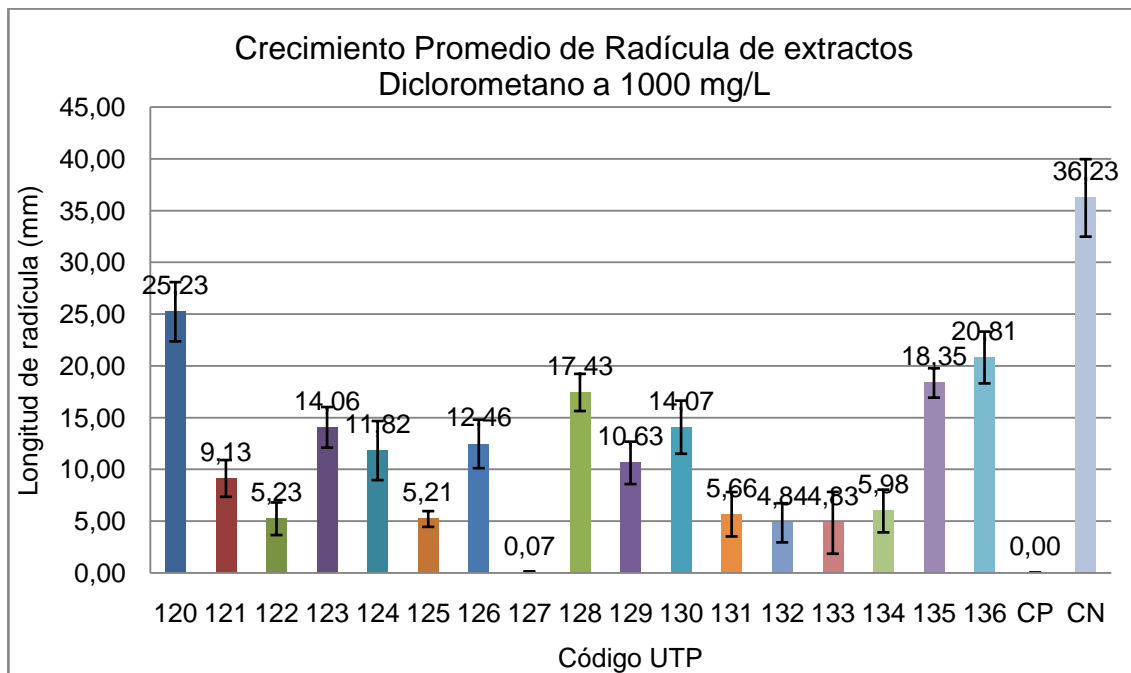
No. UTP	2000 mg/L		1000 mg/L		500 mg/L		125 mg/L	
	CPR (mm)	PRG (%)	CPR (mm)	PRG (%)	CPR (mm)	PRG (%)	CPR (mm)	PRG (%)
120	6,7 ± 1,81	56 ± 0,101	25,2 ± 2,86	87 ± 0,038	17,63 ± 2,89	93 ± 0,03	NA	NA
121	1,8 ± 0,64	39 ± 0,095	9,1 ± 1,78	80 ± 0,077	11,75 ± 1,72	78 ± 0,05	NA	NA
122	1,3 ± 0,65	18 ± 0,048	5,2 ± 1,58	80 ± 0,077	15,22 ± 1,07	84 ± 0,04	NA	NA
123	2,0 ± 0,43	47 ± 0,102	14,1 ± 1,96	91 ± 0,022	18,43 ± 2,16	92 ± 0,04	NA	NA
124	2,7 ± 0,76	42 ± 0,100	11,8 ± 2,85	91 ± 0,089	19,33 ± 1,89	83 ± 0,07	NA	NA
125	0,7 ± 0,22	17 ± 0,038	5,2 ± 0,76	76 ± 0,184	14,42 ± 1,28	88 ± 0,03	NA	NA
126	4,5 ± 1,03	54 ± 0,076	0,1 ± 0,07	2 ± 0,022	0,93 ± 0,45	23 ± 0,06	NA	NA
127	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	12,5 ± 2,34	91 ± 0,059	16,39 ± 1,48	90 ± 0,04	5,63 ± 1,22	57 ± 0,07
128	1,3 ± 0,52	23 ± 0,075	17,4 ± 1,80	93 ± 0,000	15,79 ± 1,60	88 ± 0,04	NA	NA
129	1,6 ± 0,75	19 ± 0,044	10,6 ± 2,05	87 ± 0,000	12,61 ± 0,85	84 ± 0,03	NA	NA
130	2,2 ± 0,41	37 ± 0,101	14,1 ± 2,57	89 ± 0,059	11,89 ± 1,55	87 ± 0,04	NA	NA
131	1,7 ± 0,51	67 ± 0,102	5,7 ± 2,14	71 ± 0,135	17,40 ± 3,02	79 ± 0,07	NA	NA
132	2,8 ± 0,71	56 ± 0,078	4,8 ± 1,89	76 ± 0,080	21,00 ± 1,59	91 ± 0,03	NA	NA
133	1,4 ± 0,29	40 ± 0,051	4,8 ± 2,99	51 ± 0,059	13,34 ± 3,11	84 ± 0,03	NA	NA
134	12,5 ± 1,67	79 ± 0,047	6,0 ± 2,06	80 ± 0,139	12,95 ± 1,56	82 ± 0,05	NA	NA
135	2,1 ± 0,53	42 ± 0,123	18,3 ± 1,42	93 ± 0,038	17,17 ± 1,90	91 ± 0,03	NA	NA
136	5,0 ± 0,59	57 ± 0,082	20,8 ± 2,50	98 ± 0,022	18,88 ± 2,90	81 ± 0,08	NA	NA
CN	31,7 ± 4,27	100 ± 0,000	36,2 ± 3,74	100 ± 0,000	29,91 ± 3,54	100 ± 0,00	29,51 ± 3,27	97 ± 0,02
CP	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00

NE: No evaluado

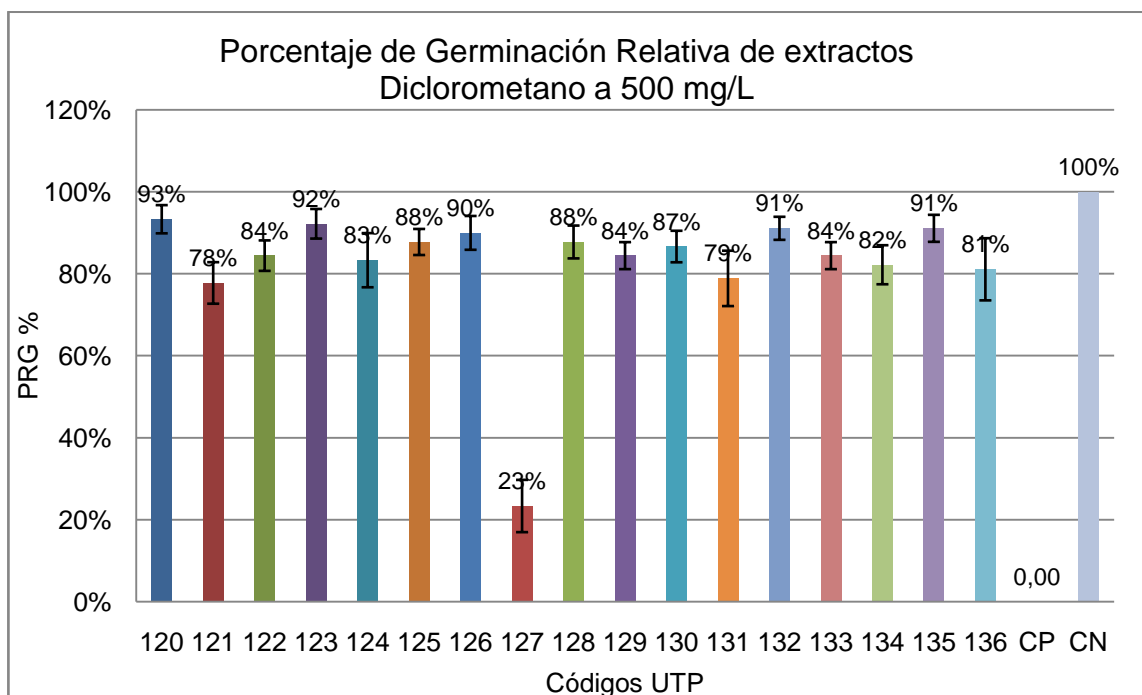
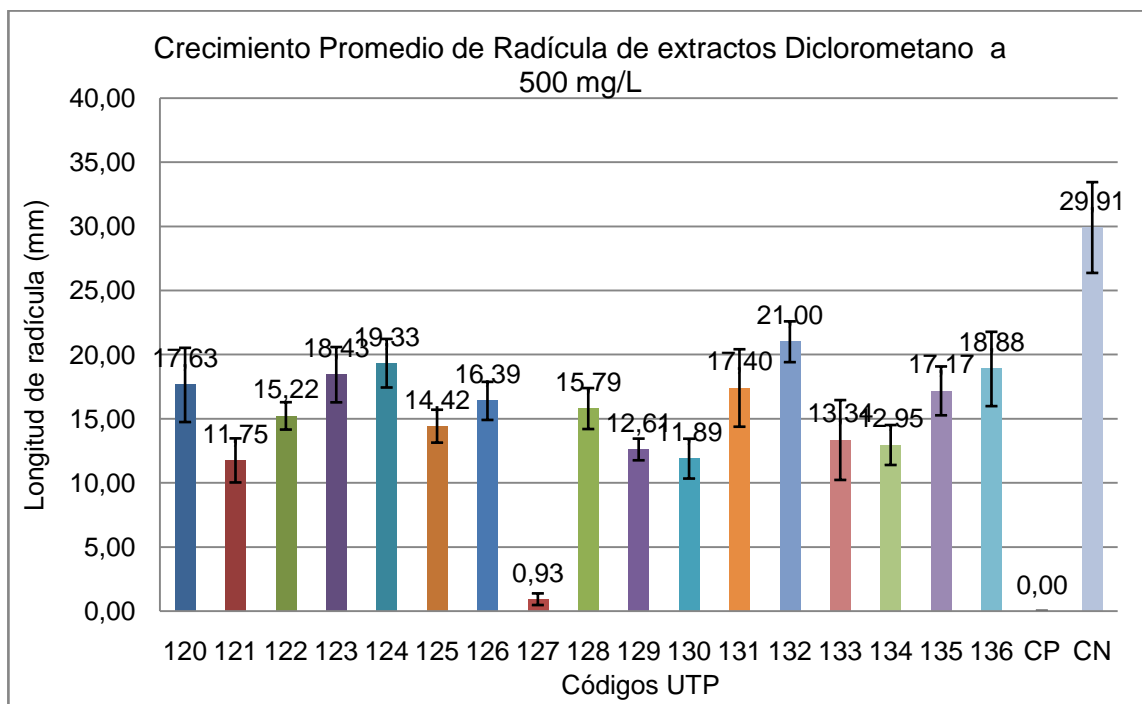
ANEXO 2. Crecimiento Promedio de Radícula (CPR) y Porcentaje de Germinación Relativo (PGR) para extractos diclorometano a 2000 mg/L.



ANEXO 3. Crecimiento Promedio de Radícula (CPR) y Porcentaje de Germinación Relativo (PGR) para extractos diclorometano a 1000 mg/L.



ANEXO 4. Crecimiento Promedio de Radícula (CPR) y Porcentaje de Germinación Relativo (PGR) para extractos diclorometano a 500 mg/L.

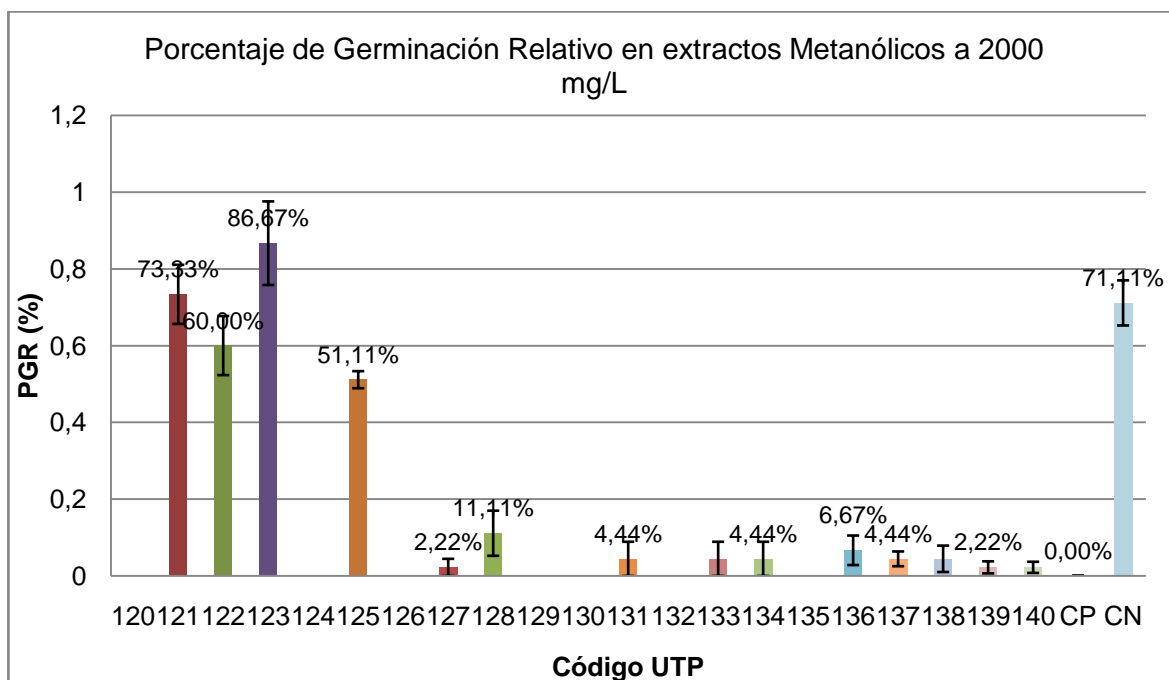
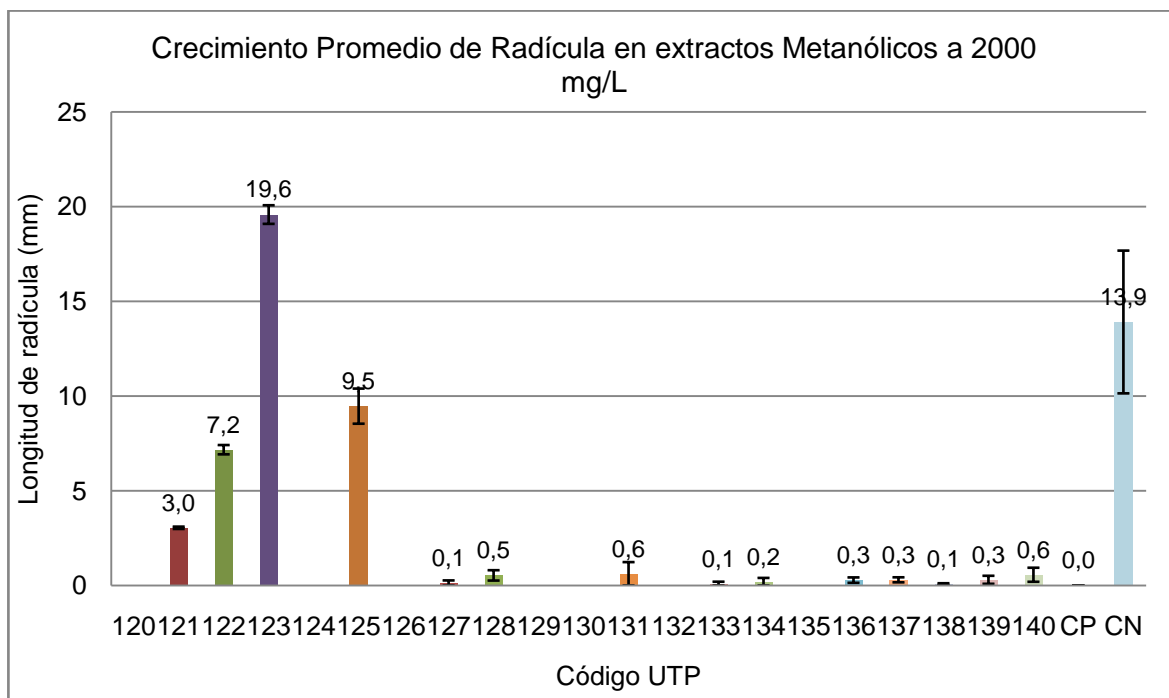


ANEXO 5. Crecimiento Promedio de Radícula (CPR) y Porcentaje de Germinación Relativo (PGR) para extractos metanólicos.

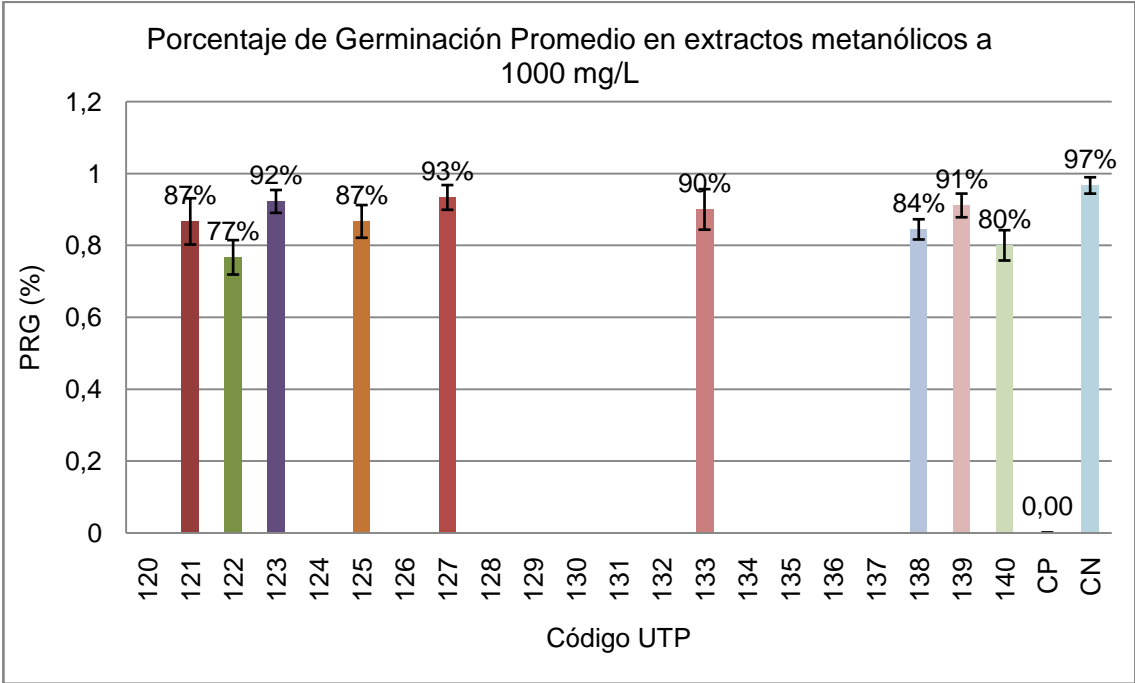
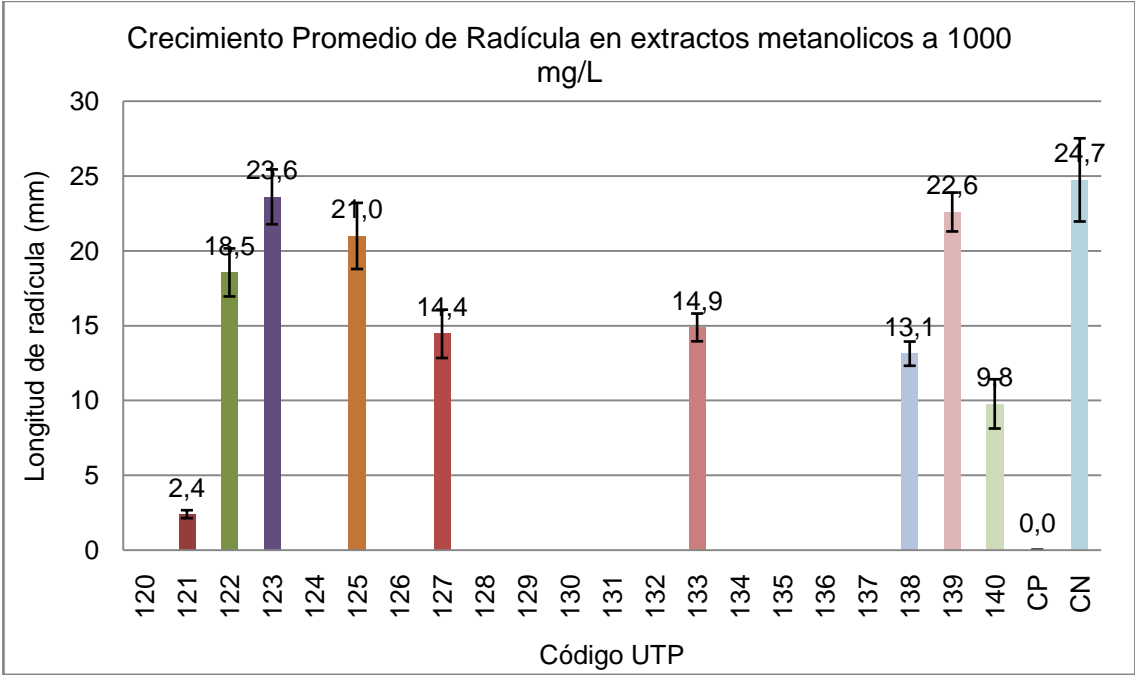
No. UTP	2000 mg/L		1000 mg/L		500 mg/L		125 mg/L		31,25 mg/L	
	CPR (mm)	PRG (%)	CPR (mm)	PRG (%)	CPR (mm)	PRG (%)	CPR (mm)	PRG (%)	CPR (mm)	PRG (%)
120	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	1,2 ± 0,22	58 ± 0,236
121	3,0 ± 0,06	73,33 ± 0,077	2,4 ± 0,27	87 ± 0,064	8,9 ± 2,65	97 ± 0,015	NA	NA	NA	NA
122	7,2 ± 0,25	60,00 ± 0,077	18,5 ± 1,61	77 ± 0,048	18,6 ± 1,23	93 ± 0,030	NA	NA	NA	NA
123	19,6 ± 0,49	86,67 ± 0,109	23,6 ± 1,83	92 ± 0,032	20,5 ± 1,22	92 ± 0,044	NA	NA	NA	NA
124	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	1,2 ± 0,24	56 ± 0,227
125	9,5 ± 0,93	51,11 ± 0,022	21,0 ± 2,21	87 ± 0,046	21,3 ± 1,56	96 ± 0,022	NA	NA	NA	NA
126	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	1,5 ± 0,17	62 ± 0,254
127	0,1 ± 0,13	2,22 ± 0,022	14,4 ± 1,62	93 ± 0,034	16,1 ± 1,39	93 ± 0,034	NA	NA	NA	NA
128	0,5 ± 0,27	11,11 ± 0,059	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	18,1 ± 2,04	93 ± 0,030	20,4 ± 1,41	91 ± 0,033	NA	NA
129	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,3 ± 0,14	25 ± 0,103
130	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,1 ± 0,04	11 ± 0,064
131	0,6 ± 0,62	4,44 ± 0,044	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,9 ± 0,26	50 ± 0,204
132	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,5 ± 0,12	34 ± 0,141
133	0,1 ± 0,10	4,44 ± 0,044	14,9 ± 0,93	90 ± 0,056	19,8 ± 0,90	94 ± 0,020	NA	NA	NA	NA
134	0,2 ± 0,20	4,44 ± 0,044	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	10,2 ± 1,08	91 ± 0,059	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,6 ± 0,26	37 ± 0,152
135	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	1,2 ± 0,32	53 ± 0,218
136	0,3 ± 0,14	6,67 ± 0,038	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	1,6 ± 0,32	62 ± 0,254
137	0,3 ± 0,13	4,44 ± 0,019	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	12,1 ± 0,79	91 ± 0,022	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	1,2 ± 0,26	56 ± 0,227
138	0,1 ± 0,05	4,44 ± 0,034	13,1 ± 0,81	84 ± 0,028	16,0 ± 0,54	92 ± 0,020	NA	NA	NA	NA
139	0,3 ± 0,21	2,22 ± 0,016	22,6 ± 1,30	91 ± 0,033	21,7 ± 1,14	97 ± 0,015	NA	NA	NA	NA
140	0,6 ± 0,37	2,22 ± 0,015	9,8 ± 1,65	80 ± 0,042	12,7 ± 1,14	90 ± 0,045	NA	NA	NA	NA
CN	13,9 ± 3,77	71,11 ± 0,059	24,7 ± 2,78	97 ± 0,023	18,7 ± 1,78	91 ± 0,033	18,7 ± 1,78	96 ± 0,022	15,9 ± 2,21	80 ± 0,327
CP	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00

NE: No evaluados

ANEXO 6. Crecimiento Promedio de Radícula (CPR) y Porcentaje de Germinación Relativo (PGR) para extractos diclorometano a 2000 mg/L.



ANEXO 7. Crecimiento Promedio de Radícula (CPR) y Porcentaje de Germinación Relativo (PGR) para extractos diclorometano a 1000 mg/L.



ANEXO 8. Crecimiento Promedio de Radícula (CPR) y Porcentaje de Germinación Relativo (PGR) para extractos diclorometano a 500 mg/L.

